

**Beiträge zur Kenntnis der
Cholindehydrogenase**

Anton Kohler



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554010_0031

Beiträge zur Kenntnis der Cholindehydrogenase

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

München



vorgelegt

von

Anton Kohler

aus

München

Oktober 1957

Geographie des Kantons der Thurgau

Geographische Beschreibung

von

Stellung der Thurgau

der

Thurgau im Schweizerischen Bundesgebiet

von

Geographisch-historischer Verein



gegründet

1861

St. Gallen

1861

gegründet

1861

Berichterstatter: 1. Prof. Dr. Dr. H. Niemer
2. Prof. Dr. F. Lynen

Tag der mündlichen Prüfung: 18.02.1957

Meinem verehrten Lehrer,

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Niemer,

möchte ich für die Überlassung des Themas und die mir bei seiner Bearbeitung gewährte Hilfe herzlich danken. Ebenso ist es mir ein Bedürfnis,

Herrn Prof. Dr. F. Lynen

für das Interesse, das er an meiner Arbeit zeigte, und für seine wertvollen Ratschläge meinen Dank auszusprechen.

Inhaltsverzeichnis

Seite

A) Einführung	1
Die Cholin oxydase	1
Problemstellung	2
B) Theoretischer Teil	4
I. Untersuchung der normalen Cholin oxydation durch die Cholin dehydrogenase.	4
a) Vorkommen und Verteilung der Cholin dehydrogenase.	4
b) Manometrische Untersuchung der Cholin oxydation durch die Cholin dehydrogenase in Mitochondrien suspension	4
c) Kolorimetrische Untersuchung der Oxydation des Cholins durch lösliche Cholin dehydrogenase	8
d) Kinetische Deutung der Reaktion	10
II. Spezifität und Selektivität der Cholin dehydrogenase.	12
a) Versuche zur Spezifität der Cholin dehydrogenase	12
b) Diskussion der Versuchsergebnisse	15
III. Inhibition der Cholin dehydrogenase durch quartäre Ammonium- salze	18
a) Untersuchungen über die Inhibition der Cholin dehydro- genase in Mitochondrien suspension durch quart. Ammoniumsalze	18
b) Inhibition der löslichen Cholin dehydrogenase durch Neurin	20
c) Diskussion der Versuchsergebnisse	23
IV. Der Einfluss von Glutathion auf die Cholin dehydrogenase.	31
a) Untersuchung des Einflusses von Glutathion-red. auf die Aktivität der Cholin dehydrogenase.	32
b) Diskussion der Versuchsergebnisse	35
V. Einfluss von Thyroxin auf die Cholin dehydrogenase	36
a) Untersuchung des Einflusses von Thyroxin auf die Veratmung von Cholin	37
b) Untersuchung der Wirkung von Thyroxin auf lösliche Cholin dehydrogenase	43
c) Diskussion der Versuchsergebnisse	44

VI. Einfluss von Vitamin K ₁ auf die Veratmung des Cholins im Cholindehydrogenasesystem	47
a) Untersuchungen über den Einfluss von Vitamin K ₁ auf die Aktivität der Cholindehydrogenase	47
b) Diskussion der Versuchsergebnisse	53
C) Praktischer Teil	55
I. Darstellung der Mitochondrienpräparate	55
II. Darstellung der löslichen Cholindehydrogenase	56
III. Erzeugung von Vitamin K ₁ -Mangel bei Ratten	56
IV. Messmethodik	57
V. Beschickung der Reaktionsgefäße	59
VI. Darstellung und Eigenschaften der quartären Ammonium- verbindungen	62
VII. Überführung der Bromide in die Chloride	68
VIII. Toxizitätswerte einiger neuer Ammoniumsalze	69
D) Zusammenfassung	70
Literaturverzeichnis	72

Einführung

Das Cholin ist als biologisch wichtiger Stoff schon lange bekannt und vor allem seine Acetylverbindung, das Acetylcholin, wurde von vielen Seiten untersucht. Erst in jüngster Zeit bekamen zwei weitere Reaktionen des Cholins biologisches Interesse, einerseits die Fähigkeit des Cholins, Methylgruppen zu biologischen Transmethylierungen abzugeben und andererseits der Vorgang der Oxydation der Carbinolgruppe des Cholins zur Carbonyl- und Carboxylgruppe bei biologischen Prozessen. Wir interessierten uns vor allem für den Fermentkomplex, durch den der Vorgang der Oxydation bewirkt wird, für die Cholin-oxydase.

Die Cholinoxydase

Die erste Andeutung der Oxydation von Cholin durch Lebergewebe geht auf eine Arbeit von BERNHEIM (Lit. 1) aus dem Jahre 1933 zurück. In der darauffolgenden Zeit bis 1942 wurden eine Reihe weiterer Untersuchungen (Lit. 2-9) veröffentlicht, in denen festgestellt wurde, dass es sich um eine spezifische Dehydrogenase-Reaktion zweier Fermentsysteme handelt, welche die Überführung des Cholins zunächst zu Betainaldehyd und weiterhin zu Betain bewirken. Durch eine Anzahl weiterer Arbeiten wurde das Phosphatbedürfnis (Lit. 10, 11) der Cholinoxydase, sowie ihre Verwicklung in den ATP- und DPN-Komplex (Lit. 7, 12-16) dargetan. Das bisher einzig sicher feststehende Glied im Wasserstofftransportsystem der Cholinoxydase scheint das Cytochrom c zu sein (Lit. 4), auf dessen Reduktion einige optische Bestimmungsmethoden für die Cholindehydrogenase aufgebaut wurden (Lit. 17, 18, 19).

Nach den Ergebnissen dieser Forschungen erfolgt die Oxydation des Cholins in zwei Stufen. Der erste Schritt ist die Dehydrierung des Cholins zu Betainaldehyd durch die Cholindehydrogenase, der zweite die Dehydrierung des Betainaldehyds zu Betain durch die Betainaldehyd-Dehydrogenase. Von diesen beiden Enzymen erwies sich die Cholindehydrogenase als cytochrom-spezifisch, während die Betainaldehyd-Dehydrogenase DPN-spezifisch ist. Diese beiden Dehydrogenasen und das damit verbundene Wasserstofftransportsystem werden zum Cholin-oxydase-System zusammengefasst.

Über die Verteilung im Lebergewebe liegen einige Arbeiten vor (Lit. 13, 17, 20-24), aus denen hervorgeht, dass die Cholindehydrogenase in der Mitochondrienfraktion konzentriert ist, während die Betainaldehyd-Dehydrogenase nach der Fraktionierung von Leberhomogenat durch Zentrifugieren im überstehenden Anteil enthalten ist. Eine geringe Anreicherung der Cholindehydrogenase glückte

WILLIAMS (Lit. 7). Die Reindarstellung der Cholindehydrogenase ist noch nicht gelungen. Auch in der Frage der prosthetischen Gruppe des Enzyms herrscht noch keine Klarheit. Von einigen Forschern wird Folsäure (Lit. 25-31) oder der Leuconostoc-citrovorum-Faktor (folinic acid) (Lit. 32, 33) diskutiert, während andere Forscher das Vorhandensein einer Sulfhydrylgruppe (Lit. 34-36) in der prosthetischen Gruppe vermuten.

Erheblich gesteigertes Interesse erlangte die Cholin oxydase nach Bekanntwerden der Ergebnisse von MUNTZ und DUBNOFF. V. DU VIGNEAUD hatte bei seinen Untersuchungen über die Transmethylierung festgestellt, dass Cholin und Betain als biologische Methylendonatoren wirken (Lit. 37, 38). MUNTZ (Lit. 39) u. DUBNOFF (Lit. 40-42) gelang nun der Nachweis, dass zur Verwertbarmachung der Methylgruppen des Cholins bei der Transmethylierung seine Oxydation zur Stufe des Betains erforderlich ist. Dadurch erhielt die Cholin oxydase mit ihren beiden Fermenten, der Cholindehydrogenase und der Betainaldehyd-Dehydrogenase eine bedeutende Stellung im Rahmen des Transmethylierungs- und C_1 -Kreislaufes, die durch das Schema Seite 3 erläutert sei.

Problemstellung

Aus dem Fermentkomplex der Cholin oxydase wählten wir das Ferment Cholindehydrogenase zur weiteren Untersuchung. Um neuen Einblick in das System der Cholindehydrogenase zu erhalten, wurden mir folgende Aufgaben zur Bearbeitung übertragen:

Durch Zusatz von verschiedenen quartären Ammoniumsalzen als Substrat an Stelle von Cholin sollte eine Klärung bezüglich Spezifität und Selektivität der Cholindehydrogenase gewonnen werden.

Bei der schon in einigen Arbeiten angedeuteten Inhibition der Cholindehydrogenase nach Zugabe von Aminen und Ammoniumsalzen sollte eine eventuelle Beziehung zwischen Konstitution und Hemmwirkung des Inhibitors herausgestellt werden.

Die Prüfung des Verhaltens der Cholindehydrogenase gegenüber Verbindungen mit Sulfhydrylgruppe im Molekül sollte zu Aussagen über die bis jetzt in der prosthetischen Gruppe der Cholindehydrogenase angenommene SH-Gruppe führen.

Wegen der festgestellten Phosphatabhängigkeit der Cholindehydrogenase (Lit. 10-16) liessen sich interessante Ergebnisse erwarten, wenn man das Verhalten der Cholindehydrogenase gegenüber Thyroxin und Vitamin K_1 in vivo und in vitro untersuchte.

Zur Überprüfung der manometrisch erhaltenen Ergebnisse sollte eine kolorimetrische Methode entwickelt werden. Dazu erwies es sich als erforderlich, die unlösliche Cholindehydrogenase aus den Mitochondrien zu eluieren und in zellfreier Lösung zu arbeiten.

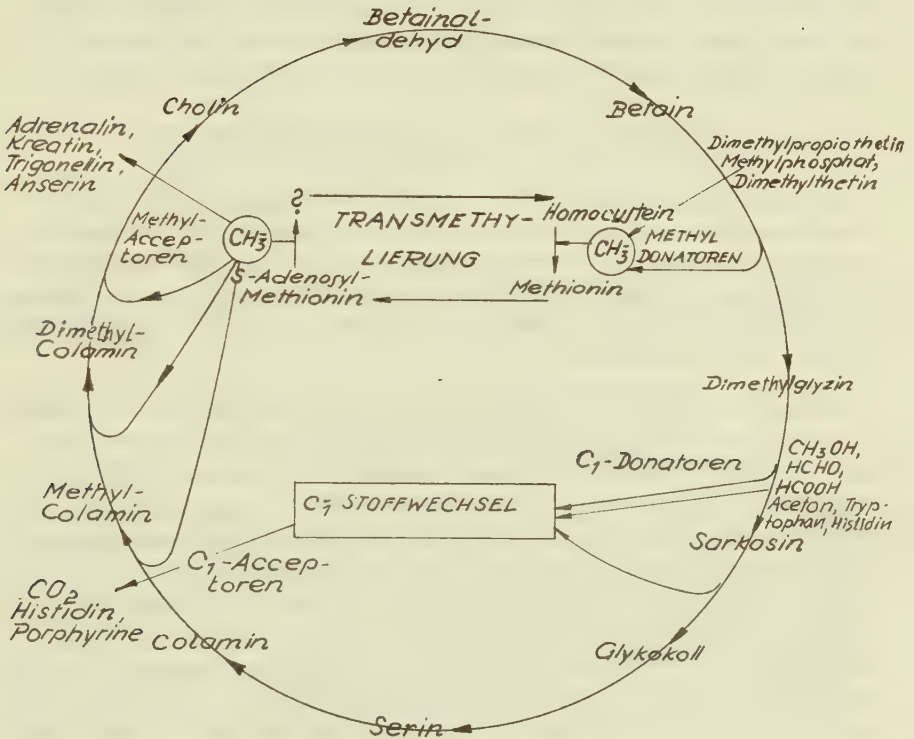


Abb. 1 Der Cholinreislauf (unter Berücksichtigung von Transmethylierung und C₁-Stoffwechsel)

B) Theoretischer Teil

I. Untersuchung der normalen Cholinoxydation durch die Cholindehydrogenase

Voraussetzung für die Klärung der zuvor angeführten Fragen war die Kenntnis der Verhältnisse, welche bei der reinen normalen Cholinoxydation vorliegen. Es wurde deshalb zunächst die normale Cholinoxydation untersucht und die dafür bestmöglichen Versuchsbedingungen ermittelt. Die Cholinveratmung durch die Cholindehydrogenase kann, neben anderen Bestimmungsmethoden, durch die Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs verfolgt werden. Wir bedienten uns bei einem Grossteil unserer Untersuchungen dieser Methode; der Sauerstoffverbrauch wurde in üblicher Weise in der Warburg-Apparatur gemessen.

a) Vorkommen und Verteilung der Cholindehydrogenase

Das Cholinoxydase-System ist hauptsächlich in der Leber, daneben im Knochenmark und zu einem geringen Anteil auch in den Nieren von Vögeln, Affen, Katzen, Ratten usw. vorhanden, dagegen nicht beim Meerschweinchen. Zur Gewinnung der Cholindehydrogenase verwandten wir, vor allem der einfachen Haltung wegen, Ratten eines Inzuchtstammes, aus deren Leber die Atmungspräparate dargestellt wurden.

Zerlegt man das Rattenleberhomogenat durch Zentrifugieren in die einzelnen Fraktionen, so findet man die Cholindehydrogenase zum überwiegenden Teil in der Mitochondrienfraktion, während das Überstehende und die Mikrosomenfraktion fast völlig frei von Cholindehydrogenase sind. Dagegen ist in der überstehenden Fraktion die Hauptmenge der Betainaldehyddehydrogenase enthalten. Zwei einander entsprechende Versuche, einerseits unter Verwendung von Mitochondrien (Kurve 1) und andererseits unter Verwendung von Überstehendem (Kurve 4) — unter sonst gleichen Versuchsbedingungen — sind in Abb. 2 mit aufgenommen. Die Versuchsergebnisse bestätigen die Anreicherung der Cholindehydrogenase in den Mitochondrien. Zugleich zeigt sich, dass die angewandte Darstellungsmethode der Mitochondrienpräparate (beschrieben im praktischen Teil) den Anforderungen entspricht.

b) Manometrische Untersuchung der Cholinoxydation durch die Cholindehydrogenase in Mitochondriensuspension

Setzt man die Mitochondriensuspension (Verdünnung 1 : 3) mit Cholin als Substrat unter Luft- oder Sauerstoffatmosphäre in der Warburgapparatur an, so

ergibt sich ein Sauerstoffverbrauch, der bei konstanter Mitochondrienmenge von der Versuchsdauer und der CholinKonzentration abhängig ist.

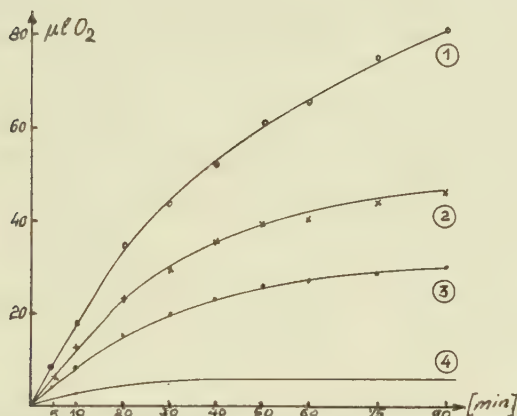


Abb. 2 Sauerstoffverbrauch bei Cholinveratmung durch die Cholindehydrogenase

- Kurve 1: Mitochondrien + 8 mg Cholinchlorid;
Kurve 2: Mitochondrien + 4 mg Cholinchlorid;
Kurve 3: Mitochondrien + 2 mg Cholinchlorid;
Kurve 4: Überstehendes + 8 mg Cholinchlorid.

In Abb. 2 ist als Ergebnis eines typischen Versuchs der Sauerstoffverbrauch in μl gegen die Zeit in Minuten aufgetragen. Die Kurven 1-3 geben den Sauerstoffverbrauch bei Zusatz verschiedener Cholinmengen (8, 4, 2 mg) zu Mitochondrien, Kurve 4 bei Zusatz von 8 mg Cholinchlorid zum Überstehenden an. Die starke und konzentrationsabhängige Cholinveratmung des Mitochondrienpräparats ist deutlich zu erkennen. Es lässt sich auch feststellen, dass während der ersten 10 Minuten der Sauerstoffverbrauch annähernd proportional mit der Zeit zunimmt.

Der Reaktionsablauf während dieser Zeitspanne wurde einer genaueren Untersuchung unterzogen, wobei der O_2 -Verbrauch alle 2 Minuten abgelesen wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 und in Abb. 3 zusammengefasst. Die Daten der Ablesungen nach 5 und nach 10 Minuten wurden aus 20 beliebig herausgegriffenen Versuchen der weiteren Arbeitsgebiete ermittelt. Trotz der grossen Streuung der Ablesung bei diesen geringen Sauerstoffmengen ist die Proportionalität zwischen Sauerstoffverbrauch und Zeit aus dem geradlinigen Verlauf der Kurve ersichtlich.

Tab. 1: Sauerstoffverbrauch bei Veratmung von 4 mg ($2.87 \cdot 10^{-5}$ Mol) Cholinchlorid während der ersten 12 Minuten

n	Zeit Min.	Mittelwerte O ₂ -Verbrauch		$\sigma = \sqrt{\frac{\sum x^2}{n}}$	a - x Mol $\cdot 10^{-5}$	k $\cdot 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$
		μl	Mol $\cdot 10^{-7}$			
5	2	1.9	0.848	± 1.02	2.8616	1.49
4	4	3.8	1.69	± 1.0	2.853	1.495
20	5	4.7	2.09	± 0.9	2.849	1.47
5	6	5.6	2.50	± 0.9	2.845	1.45
5	8	7.6	3.39	± 0.94	2.836	1.49
20	10	9.3	4.15	± 0.85	2.828	1.47
4	12	11.1	4.95	± 1.05	2.821	1.45

Die in der Spalte (a - x) aufgeführten Werte geben die jeweils noch vorhandene Cholinchloridkonzentration in Mol an, welche aus der Anfangskonzentration abzüglich der zu Betainaldehyd oxydierten Menge errechnet wurden. In der letzten Spalte sind die berechneten Geschwindigkeitskonstanten eingetragen.

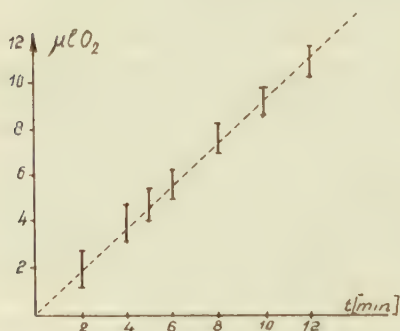


Abb. 3 Zunahme des Sauerstoffverbrauchs in μl während der ersten 12 Minuten bei Veratmung von 4 mg Cholinchlorid.

Bei längerer Versuchsdauer wird die Zunahme des Sauerstoffverbrauchs unstetig, der Verbrauch je Zeiteinheit nimmt langsam ab. Dieser Abfall ist teilweise auf die Inaktivierung des Enzyms, aber auch auf die kompetitive Hemmwirkung und auf die einsetzende Gegenreaktion durch den entstandenen Betainaldehyd zurückzuführen. Betainaldehyd hemmt, wie von verschiedenen

Autoren festgestellt wurde (Lit. 13, 15), die Cholin oxydation. Abb. 4 zeigt ein Beispiel für die Beeinflussung der Cholin oxydation durch zugesetzten Betainaldehyd.

Die von ROTHSCILD, CORI u. BARRON (Lit. 36) vorgeschlagene Reaktionsgleichung für die Cholinveratung durch die Cholin dehydrogenase deutet ebenfalls die Reversibilität der Reaktion an, sowie die Verschiebung des Gleichgewichts nach links, wenn man berücksichtigt, dass der Aldehyd aus dem System nicht entfernt wird.

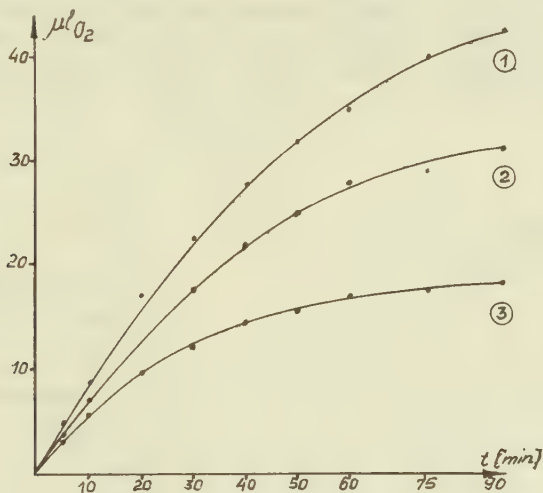
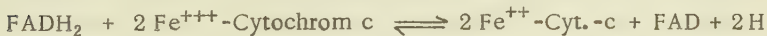
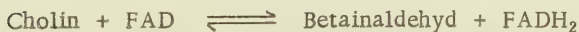


Abb. 4 Hemmung der Cholin oxydation bei Zugabe von Betainaldehyd.

Kurve 1: 4 mg Cholinchlorid; Kurve 2: 4 mg Cholinchlorid + 0.5 mg Betainaldehyd; Kurve 3: 4 mg Cholinchlorid + 1.0 mg Betainaldehyd.



c) Kolorimetrische Untersuchung der Oxydation des Cholins
durch lösliche Cholindehydrogenase

Zur Überprüfung und Sicherstellung der vorherigen Resultate wurden dieselben Untersuchungen unter Anwendung einer anderen Messmethode durchgeführt. Dazu war es notwendig, die Cholindehydrogenase in lösliche und mitochondrienfreie Form überzuführen. Das aus den aceton-getrockneten Mitochondrien dargestellte Cholsäure-Eluat zeigte in der Warburgapparatur bei Cholinzusatz keinen Sauerstoffverbrauch an. Dagegen liess sich bei Verwendung von Dichlorphenoldiphenol (DPhI) als Wasserstoffacceptor eine kolorimetrische Methode entwickeln. Die Messung erfolgte im Photometer EPPENDORF. Die Messmethode und die Darstellung des Cholindehydrogenase-Präparats sind im praktischen Teil beschrieben.

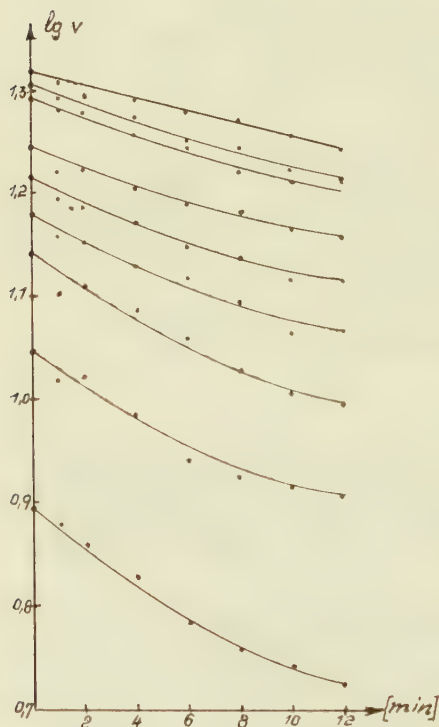


Abb. 5 Reaktionsgeschwindigkeit
bei verschiedenen Cholinkonzentrationen.

Die Substratkonzentration bei den Kurven von unten nach oben ist:

Mol/l $\cdot 10^{-3}$;
 0.239; 0.478; 0.715; 0.957;
 1.19; 1.43; 2.39; 4.78;
 7.16.

Abb. 5 zeigt die Ergebnisse einer Reihe von Versuchen nach einem von LYNEN u. SCHERER (Lit. 43) angegebenen Verfahren, welches sich auch in diesem Falle als sehr vorteilhaft für die graphische Extrapolation von v_0 , der Anfangsgeschwindigkeit erwies.

Die pS-Kurve, d.h. die Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion der Substratkonzentration ist als Vergleichskurve in Abb. 11, S. 21 mitaufgenommen.

In Abb. 6 ist die Auswertung der erhaltenen v_0 - und (S)-Werte nach der Geradengleichung von LINEWEAVER u. BURK (Lit. 44)

$$\frac{1}{v} = \frac{K}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}}$$

durchgeführt.

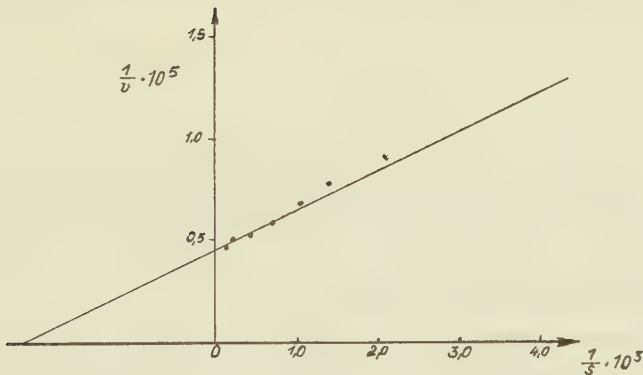


Abb. 6: Geradengleichung nach LINEWEAVER u. BURK für lösliche Cholin-
dehydrogenase

Die Werte für die maximale Geschwindigkeit und die MICHAELIS-Konstante errechneten sich zu:

$$V_{\max} = 2.25 \cdot 10^{-5}, \quad K_M = 4.35 \cdot 10^{-4}.$$

d) Kinetische Deutung der Reaktion

Im allgemeinen verlaufen enzymatische Reaktionen *in vitro* nach einer (als ob) Reaktionsgleichung nullter Ordnung, da die Konzentration an Substrat sehr viel grösser ist als die Enzymkonzentration. Der Verlauf der Oxydation des Cholins durch die Cholindehydrogenase zu Betainaldehyd kann jedoch während der Anfangsperiode als Reaktion erster Ordnung aufgefasst werden. Trägt man auf der Ordinate $\ln a - x$ gegen t auf der Abszisse auf, so erhält man sowohl bei den manometrischen Untersuchungsergebnissen mit Mitochondrien (Abb. 7a), als auch bei den kolorimetrischen Resultaten mit löslicher Cholindehydrogenase (Abb. 7b) in der ersten Zeitperiode von etwa 10 Minuten eine Gerade, deren konstanter Geschwindigkeitsfaktor die Annahme einer Reaktion erster Ordnung bestätigt. Hierbei bedeuten a die Anfangskonzentration an Cholinchlorid, x die umgesetzte CholinKonzentration, welche aus dem Sauerstoffverbrauch berechnet wurde, und t die Zeit in Minuten.

Die Grösse der Geschwindigkeitskonstanten k in diesem Zeitintervall wurde nach der Reaktionsgleichung

$$\ln \frac{a}{a - x} = k \cdot t$$

im Mittel zu $k = 1.48 \cdot 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ für die Ergebnisse nach der manometrischen, und zu $k = 2.46 \cdot 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ für die Ergebnisse nach der kolorimetrischen Bestimmungsmethode errechnet. Diese Werte zeigen bei Berücksichtigung der verschiedenen Beobachtungsmethoden und der grossen Fehlerbreite der beiden Versuchsanordnungen gute Übereinstimmung.

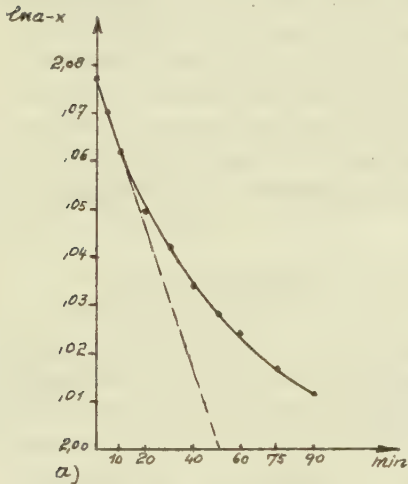
Die Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit im weiteren Verlauf der Oxydation des Cholins kann zum Teil auf die normale Inaktivierung des Enzyms bei den von uns angewandten Versuchsbedingungen zurückgeführt werden. Andererseits muss aber auch der Zusammenhang zwischen Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit und Zunahme der Konzentration an Betainaldehyd berücksichtigt werden, der, wie bereits oben erörtert, durch kompetitive Hemmung und Reversibilität der Reaktion zu erklären sein wird.

Nun darf aber von *in vitro* gewonnenen Versuchsergebnissen nicht unbedingt auf analoge Verhältnisse *in vivo* zurückgeschlossen werden. *In-vitro*-Versuche sind in mancherlei Hinsicht unvollkommen. Sie erfassen nur ein Glied eines *in vivo* in sich geschlossenen Kreislaufsystems, wodurch qualitativ und quantitativ verschobene Resultate entstehen können. Bei der Cholin oxydation *in vivo* wird der entstehende Betainaldehyd durch eine Reihe weiterer Fermente aus dem

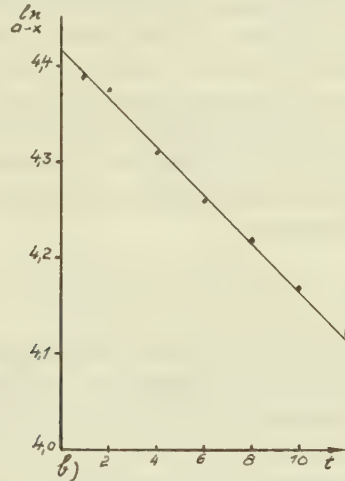
Gleichgewicht entfernt und verbraucht, während bei unseren in-vitro-Bedingungen der Betainaldehyd nicht weiter verarbeitet wird, er sich anreichern und zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes, eventuell sogar zu einer Blockierung des Fermentsystems beitragen kann.

Abb. 7: Graphische Auswertung der Gleichung $\ln \frac{a}{a-x} = k \cdot t$

für die Reaktion: Cholin $\xrightarrow[\text{Cholindehydrogenase}]{- 2 H}$ Betainaldehyd



a) Manometrisch für Mitochondriensuspension erhaltene Werte.



b) Kolorimetrisch für lösliche Cholindehydrogenase erhaltene Werte.

II. Spezifität und Selektivität der Cholindehydrogenase

Um Aussagen über den Mechanismus eines Fermentsystems machen zu können, ist eine Kenntnis von Spezifität und Selektivität des Fermentes oft von erheblicher Bedeutung. Bei der Cholindehydrogenase liegen zu diesem Problem bis jetzt zwei Untersuchungen vor. MANN, WOODWARD u. QUASTEL (Lit. 4) stellten fest, dass das Arsen-Homologe des Cholins, das Arsenocholin $(\text{CH}_3)_3\text{AsCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, ebenso, wenn auch in geringerem Masse, wie das Cholin, veratmet wird. WELLS (Lit. 45) untersuchte 1954 die Veratmung von cholinähnlichen Verbindungen, die sich gegenüber dem Cholin durch Ersatz von N-Methylgruppen durch Äthylgruppen und durch Substitution von α - oder β -Wasserstoff der Oxyäthylgruppe durch Methylgruppen unterschieden, sowie von entsprechenden Derivaten des 3-Amino-propanols, des sog. Homocholins. Er fand, dass diese Verbindungen teils in grösserem, teils in geringerem Masse oder gar nicht veratmet wurden, Ergebnisse, auf die weiter unten noch näher eingegangen werden soll. In beiden Fällen wurde keine grosse Substratspezifität der Cholindehydrogenase gefunden.

a) Versuche zur Spezifität der Cholindehydrogenase

Die Spezifität der Cholindehydrogenase wurde von uns unter Verwendung von Verbindungen, welche sich vom Cholinmolekül durch Ersatz einer Methylgruppe entweder durch homologe Alkylgruppen oder durch einen aliphatischen Rest mit funktioneller Gruppe unterschieden, getestet. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen mit der ersten Gruppe von Verbindungen, welche homologe Alkylgruppen im Molekül besitzen, wurden inzwischen durch die Veröffentlichung von WELLS (Lit. 45) bestätigt und überholt.

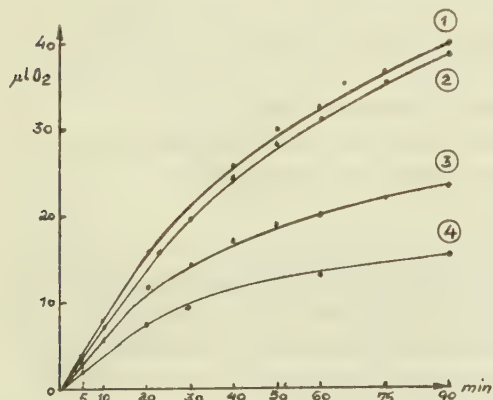
Für die Versuche mit der zweiten Gruppe von Verbindungen wurden quartäre Ammoniumsalze dargestellt, bei denen gegenüber dem Cholin (I) eine Methylgruppe durch einen mit einer funktionellen Gruppe versehenen Rest ersetzt war. Zur Untersuchung gelangten die Chloride der folgenden Verbindungen:

I. $(\text{CH}_3)_2\overset{\oplus}{\text{N}}\begin{matrix} \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$	N-Trimethyl-N- β -oxyäthyl-ammoniumhydroxyd (Cholin)
II. $(\text{CH}_3)_2\overset{\oplus}{\text{N}}\begin{matrix} \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} \end{matrix}$	N-Dimethyl-N-di- β -oxyäthyl-ammoniumhydroxyd
III. $(\text{CH}_3)_2\overset{\oplus}{\text{N}}\begin{matrix} \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br} \end{matrix}$	N-Dimethyl-N- β -oxyäthyl-N- β -bromäthyl-ammoniumhydroxyd

IV. $(\text{CH}_3)_2 \overset{\oplus}{\text{N}} \begin{cases} \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} \\ \text{CH}=\text{CH}_2 \end{cases}$	N-Dimethyl-N-äthenyl-N- β -oxyäthylammoniumhydroxyd
V. $(\text{CH}_3)_2 \overset{\oplus}{\text{N}} \begin{cases} \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} \\ \text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2 \end{cases}$	N-Dimethyl-N-propen(2)yl-N- β -oxyäthyl-ammoniumhydroxyd
VI. $(\text{CH}_3)_2 \overset{\oplus}{\text{N}} \begin{cases} \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} \\ \text{CH}_2\text{COOH} \end{cases}$	N-Dimethyl-N- β -oxyäthyl-glyzin
VII. $(\text{CH}_3)_2 \overset{\oplus}{\text{N}} \begin{cases} \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} \\ \text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5 \end{cases}$	N-Dimethyl-N- β -oxyäthyl-glyzinäthylester
VIII. $(\text{CH}_3)_3 \overset{\oplus}{\text{N}}\text{-CH}_2\text{CHOH-CHOH-CH}_2\overset{\oplus}{\text{N}}(\text{CH}_3)_3$	2,3-Dioxybutan-1,4-bis-trimethyl-ammoniumhydroxyd

Darstellung, Eigenschaften und Analysen dieser Verbindungen werden im praktischen Teil beschrieben.

Die oben aufgeführten Substanzen wurden in verschiedenen Konzentrationen mit stets gleicher Menge Mitochondriensuspension in der Warburg-Apparatur angesetzt und der Sauerstoffverbrauch nach 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75 und 90 Min. abgelesen. Die Atmung erfolgte mit Luft, da bei Versuchen mit Sauerstoff keine wesentlichen Unterschiede auftraten. Die Verbindung VI wurde vor der Zugabe durch NaOH auf p_H 7.4 gebracht.



Kurve 1: $1.15 \cdot 10^{-2}$ molare
Cholinchloridlösung;
Kurve 2: $1.15 \cdot 10^{-2}$ molare
Lösung von Verbindung II;
Kurve 3: $0.58 \cdot 10^{-2}$ molare
Lösung von Verbindung II;
Kurve 4: $0.29 \cdot 10^{-2}$ molare
Lösung von Verbindung II.

Abb. 8 Veratmung von Verbindung II

Es ergab sich dabei ein von der Substratkonzentration abhängiger Sauerstoffverbrauch, aus dem durch Vergleich mit dem parallel angesetzten Cholinversuchen die relativen Veratmungsquoten ermittelt werden konnten. Abb. 8 zeigt als Beispiel den Verlauf eines typischen Veratmungsversuchs, bei dem verschiedene Mengen der Verbindung $(\text{CH}_3)_2\text{N}^{\oplus}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$ (Verbindung II) zugesetzt waren.

Als weiteres Beispiel ist in Abb. 9 ein analoger Versuch mit der Verbindung $(\text{CH}_3)_2\text{N}^{\oplus}\begin{matrix} \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} \\ \text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2 \end{matrix}$ (Verbindung V) angeführt, die einen wesentlich niedrigeren Sauerstoffverbrauch bei gleichen Konzentrationen zeigt.

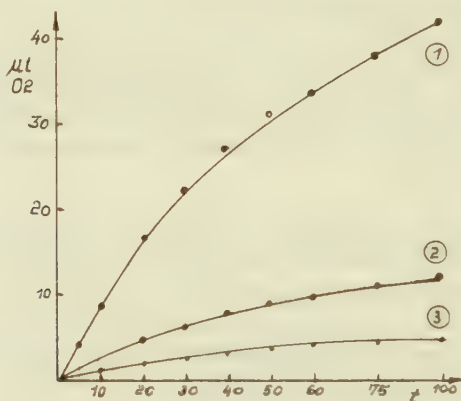


Abb. 9 Veratmung von Verbindung V

- Kurve 1: $1.15 \cdot 10^{-2}$ molare Cholinchloridlösung;
 Kurve 2: $1.15 \cdot 10^{-2}$ molare Lösung von Verbindung V;
 Kurve 3: $0.29 \cdot 10^{-2}$ molare Lösung von Verbindung V.

Zu ähnlichen Resultaten führten sämtliche von uns untersuchte Verbindungen dieser Klasse. Einzig das Butandiolderivat (Verbindung VIII) wurde von der Cholindehydrogenase nicht oxydiert. Auch bei diesen für die Cholindehydrogenase oxydablen Verbindungen konnte während der ersten 10-15 Minuten der Versuchsdauer an Hand der beobachteten Sauerstoffaufnahme festgestellt werden, dass die Oxydation nach dem Schema einer Reaktion 1. Ordnung verläuft.

In der Tabelle 2 sind die Ergebnisse von sieben typischen Vergleichsreihen bei einer Konzentration von $1.15 \cdot 10^{-2}$ Mol/l zusammengefasst. Der Sauerstoffwert ist umgerechnet auf ein Mol der betreffenden Verbindung. Die Prozentangaben beziehen sich auf den Sauerstoffverbrauch von einem Mol Cholin (= 100 %).

Tab. 2: Substratspezifität der Cholindehydrogenase
für einige cholinähnliche Substanzen

Substrat $(\text{CH}_3)_2\overset{\oplus}{\text{N}}\begin{matrix} \diagup \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} \\ \diagdown \text{R} \end{matrix}$		$\mu\text{l O}_2$ -Verbrauch/Mol in 90 Min. bei $1.15 \cdot 10^{-2}$ Mol/l		Mittlere Abweichung $\sigma = \sqrt{\frac{\sum x^2}{n}}$	Relative Veratmungs- quote Mittel- wert%
		Extremwerte	Mittelwert		
R = -CH ₃	14	1795 - 1690	1716	± 28	100
R = -CH ₂ CH ₂ OH	6	1760 - 1610	1680	± 42	97.8
R = -CH ₂ CH ₂ Br	4	1460 - 1320	1390	± 50	81.3
R = -CH ₂ CH=CH ₂	4	535 - 470	500	± 26	29.2
R = -CH ₂ COOC ₂ H ₅	3	490 - 435	460	± 23	26.6 ^{x)}
R = -CH=CH ₂	6	330 - 290	310	± 14	18.1
R = -CH ₂ COOH	4	290 - 265	280	± 11	16.2
$[(\text{CH}_3)\overset{\oplus}{\text{N}}\text{CH}_2\text{CHOH}]_2$	2	0 - 0	0	-	0

^{x)} Ohne Berücksichtigung von Verseifung und Alkoholoxydation.

Wie aus der Tabelle 2 ersichtlich, erhielt man für die Verbindungen II-VII relative Veratmungsquoten zwischen 97% und 16% bei einer molaren Konzentration von $1.15 \cdot 10^{-2}$ Mol/l. Das Butandiolderivat wurde nicht veratmet. Entsprechende Resultate wurden auch bei Ansätzen mit anderen Konzentrationen erzielt.

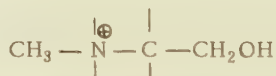
b) Diskussion der Versuchsergebnisse

In der Frage der Substratspezifität der Cholindehydrogenase ergab sich in Übereinstimmung mit den Versuchen von MANN u. Mitarbeitern (Lit. 4) und

WELLS (Lit. 45) eine geringe Selektivität für das zur Veratmung vorgelegte Molekül. Die Substitution einer Methylgruppe im Cholinmolekül durch einen anderen Rest scheint keinen allzugrossen Einfluss auf die Molekulspezifität der Cholindehydrogenase zu haben, da sämtliche von uns und WELLS untersuchten Substanzen dieser Art oxydiert wurden.

So wird z.B. das Dioxyäthylderivat (II) mit fast dem gleichen Sauerstoffverbrauch veratmet wie das Cholin (98% : 100%). Ebenso macht sich die Substitution einer Methylgruppe durch eine Bromäthylgruppe (III) im Cholinmolekül in der Veratmungsquote nur wenig bemerkbar (81%). Dagegen sinkt der Sauerstoffverbrauch bei den Verbindungen, bei welchen eine Methylgruppe durch einen Substituenten mit Doppelbindung oder Carboxylgruppe ersetzt wurde, auf etwa ein Drittel bis auf ein Fünftel des Cholinsauerstoffverbrauchs ab. Es konnten aber keine Gesetzmässigkeiten in der Abnahme des Sauerstoffverbrauchs festgestellt werden, aus welchen Rückschlüsse auf den Einfluss der funktionellen Gruppen gezogen werden könnten. Auf jeden Fall dürfte feststehen, dass die Cholindehydrogenase eine geringe Selektivität für das zur Veratmung angebotene Substrat besitzt, da sonst bei diesen Substanzen überhaupt kein Sauerstoff hätte verbraucht werden dürfen.

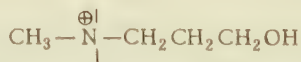
Dagegen dürfte der Cholindehydrogenase nach den von uns und von WELLS (siehe Tabelle 3) gefundenen Ergebnissen eine ziemliche Spezifität in Bezug auf die Konfiguration



mit endständiger β -Hydroxylgruppe zukommen. So erhielten wir bei einer Konfiguration



keinen Sauerstoffverbrauch und WELLS bei der Konfiguration

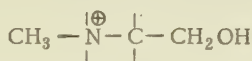


nur 5% und beim Triäthylcholin keine Atmung.

Tab. 3: Veratmung verschiedener cholinähnlicher Verbindungen
durch Rattenleberhomogenat nach I. C. WELLS (Lit. 45)

Verbindung	Relat. Verat- mungsquote; Cholin = 100	Verbindung	Relat. Verat- mungsquote; Cholin = 100
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{CH}_3 - \text{N}^+ - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} \\ \diagup \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{array}$	79	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ (\text{CH}_3)_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	105
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{C}_2\text{H}_5 - \text{N}^+ - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} \\ \diagup \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{array}$	24	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ (\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	8
$\begin{array}{c} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \diagdown \\ \text{C}_2\text{H}_5 - \text{N}^+ - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} \\ \diagup \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{array}$	0	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ (\text{CH}_3)_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	41
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{CH}_3 - \text{N}^+ - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}$	5	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ (\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	5

Aus dieser anscheinenden Spezifität der Cholindehydrogenase für die Konfiguration



darf aber nicht der Schluss gezogen werden, dass diese Konfiguration Bedingung sei für die Verwertbarkeit der Methylgruppe zu Transmethylierungen – nach der Oxydation dieser Verbindungen zur entsprechenden Betainform – da von einigen Verbindungen dieser Konfiguration bekannt ist, dass sie keine Methylendonatoren sind (Lit. 46). Das für die wichtige Frage der Verwertbarkeit von ähnlichen Substraten als Methylendonatoren spezifische Ferment kann also nicht die Cholindehydrogenase sein, dürfte aber unter den nachfolgenden Fermentsystemen der Transmethylierungsfermente zu suchen sein.

III. Inhibition der Cholindehydrogenase durch quartäre Ammoniumsalze

Die erste Feststellung der Hemmung der Cholin oxydase durch Amine geht auf MANN und Mitarbeiter (Lit. 4) zurück, welche NH_4^+ , $\text{HN}^+(\text{CH}_3)_3$ und Betain untersuchten. Stickstoff-Lost und ähnliche Verbindungen wurden in einer Reihe von Veröffentlichungen als starke Inhibitoren der Cholindehydrogenase beschrieben (Lit. 47-48). Eine ähnliche Hemmwirkung fanden auch andere Forscher bei Zusatz von Aminen, Ammoniumsalzen und Aminosäuren (Lit. 9, 14, 50). WELLS (Lit. 45) bemerkte eine Inhibition der Cholindehydrogenase bei Zusatz von Ammoniumsalzen, welche eine β -Hydroxylgruppe im Molekül tragen.

a) Untersuchungen über die Inhibition der Cholindehydrogenase in Mitochondriensuspension durch quartäre Ammoniumsalze

In Erweiterung der bisher zu diesem Problem durchgeführten Untersuchungen wurde von uns der Einfluss von quartären Ammoniumsalzen mit funktionellen Gruppen im Molekül auf die Veratmung von Cholin durch die Cholindehydrogenase einer Prüfung unterworfen.

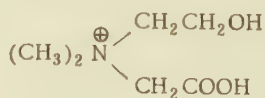
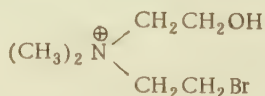
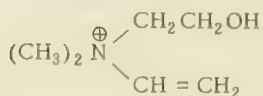
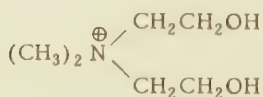
Zu diesem Zweck wurden Versuchsreihen mit drei Klassen von quartären Ammoniumsalzen, welche sich durch ihre funktionellen Gruppen unterschieden, angesetzt:

1. Verbindungen mit einer β -Hydroxyäthylgruppe im Molekül,
2. Verbindungen mit einer Doppelbindung im Molekül und
3. Verbindungen mit einer β -Halogenäthylgruppe im Molekül.

Diese Substanzen wurden in den Versuchsreihen dem Versuchsgrundansatz in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt, 12 Minuten lang inkubiert (38°C) und ihr Einfluss auf den Sauerstoffverbrauch einer $1.15 \cdot 10^{-2}$ molaren Konzentration an Cholinchlorid über den Zeitraum von 90 Minuten verfolgt. Die Cholinvergleichsgefäße wurden zur Vermeidung rein tonischer Effekte mit der entsprechenden Menge Kochsalzlösung beschickt.

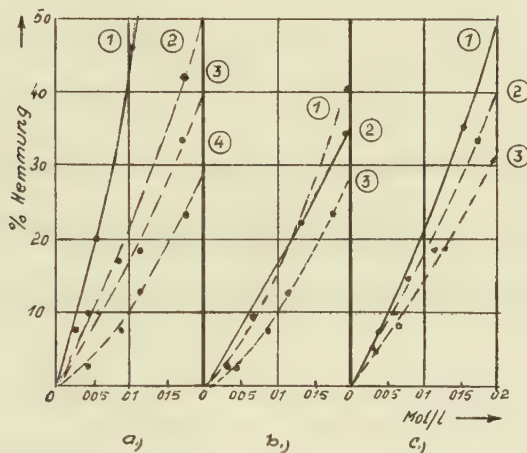
1.) Zusatz von Verbindungen mit β -Hydroxyäthylgruppen im Molekül

Es wurde die Hemmwirkung der Chloride folgender Verbindungen untersucht:



Das Glyzinderivat wurde vor Zugabe durch NaOH auf p_H 7.4 gebracht. Die Ergebnisse aus diesen Versuchen sind in Abb. 10a zusammengefasst.

Abb. 10: Hemmwirkung von Ammoniumsalzen auf die Oxydation des Cholins



a: Verbindungen mit β -Hydroxyäthylgruppe:

Kurve 1: Dimethyldi- β -hydroxyäthyl-ammoniumchlorid;

Kurve 2: Dimethyl- β -hydroxyäthylglyzin;

Kurve 3: Dimethyl- β -bromäthyl- β -hydroxyäthyl-ammoniumchlorid;

Kurve 4: Dimethyläthenyl- β -hydroxyäthyl-ammoniumchlorid.

b: Verbindungen mit Doppelbindung:

Kurve 1: Trimethyläthenyl-ammoniumchlorid (Neurinchlorid);

Kurve 2: Buten(2)-1,4-bis-trimethylammoniumchlorid;

Kurve 3: Dimethyläthenyl- β -hydroxyäthyl-ammoniumchlorid.

c: Verbindungen mit β -Halogenäthylgruppe:

Kurve 1: Dimethyldi- β -chloräthylammoniumchlorid;

Kurve 2: Dimethyl- β -hydroxyäthyl- β -bromäthylammoniumchlorid;

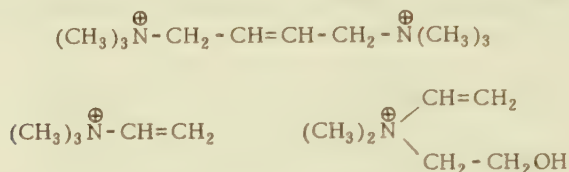
Kurve 3: Trimethyl- β -bromäthylammoniumchlorid.

Abszisse: Molare Konzentration der zugegebenen Ammoniumsalze

Ordinate: Abnahme des Sauerstoffverbrauchs bei der reinen Cholinveratmung (%).

2.) Zusatz von Verbindungen mit einer Doppelbindung im Molekül

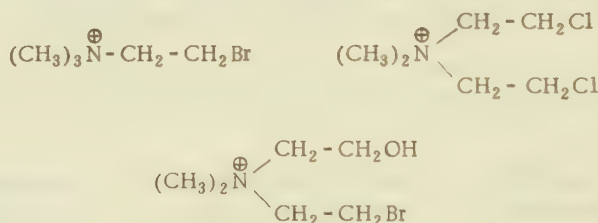
Es wurde die Hemmwirkung der Chloride folgender Verbindungen untersucht:



In Abb. 10 b sind die experimentell gewonnenen Daten graphisch eingetragen.

3.) Zusatz von Verbindungen mit Halogenäthylgruppen im Molekül

Zu diesen Untersuchungen wurden die Chloride folgender Verbindungen verwendet:



Die Resultate dieser Messungen sind in Abb. 10 c eingezeichnet.

b) Inhibition der löslichen Cholindehydrogenase durch Neurin

Um die im vorigen Abschnitt gebrachten Ergebnisse zu überprüfen und um zu Aussagen über den Mechanismus der Hemmwirkung zu gelangen, wurde eines der oben in Mitochondriensuspension verwendeten Ammoniumsalze, das Neurinchlorid, im Hinblick auf seine Hemmwirkung in löslicher Cholindehydrogenase getestet. Abb. 11 zeigt die Ergebnisse in Form der pS-Kurven. Die v_0 -Werte wurden wieder wie zuvor aus den bei der Auftragung $\lg v$ gegen t erhaltenen Kurven ermittelt (LYNEN u. SCHERER (Lit. 44)).

Nach dem Einsetzen der erhaltenen Werte in die Gleichung

$$\frac{1}{v} = \frac{K}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}}$$

ergaben sich für verschiedene Neurinkonzentrationen folgende Geraden, wie in Abb. 12 (S. 22) gezeigt werden.

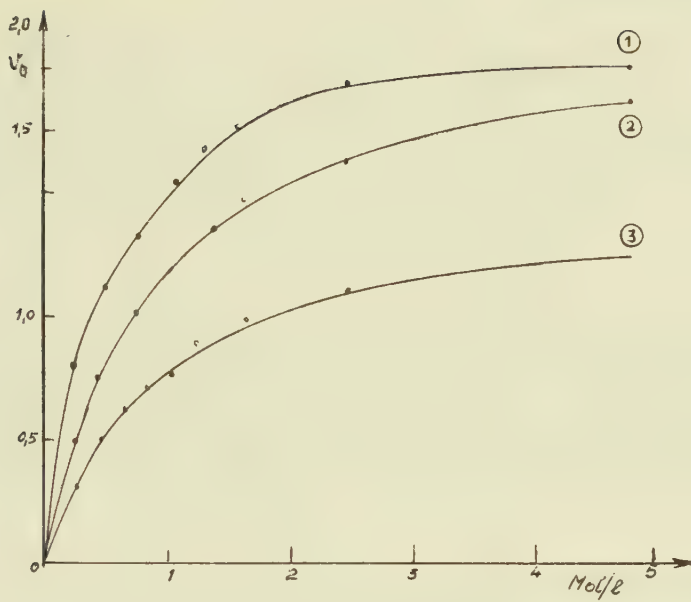


Abb. 11: pS-Kurve der löslichen Cholindehydrogenase,
ohne und mit Neurinzusatz

Kurve 1: Cholinchlorid ohne Inhibitor

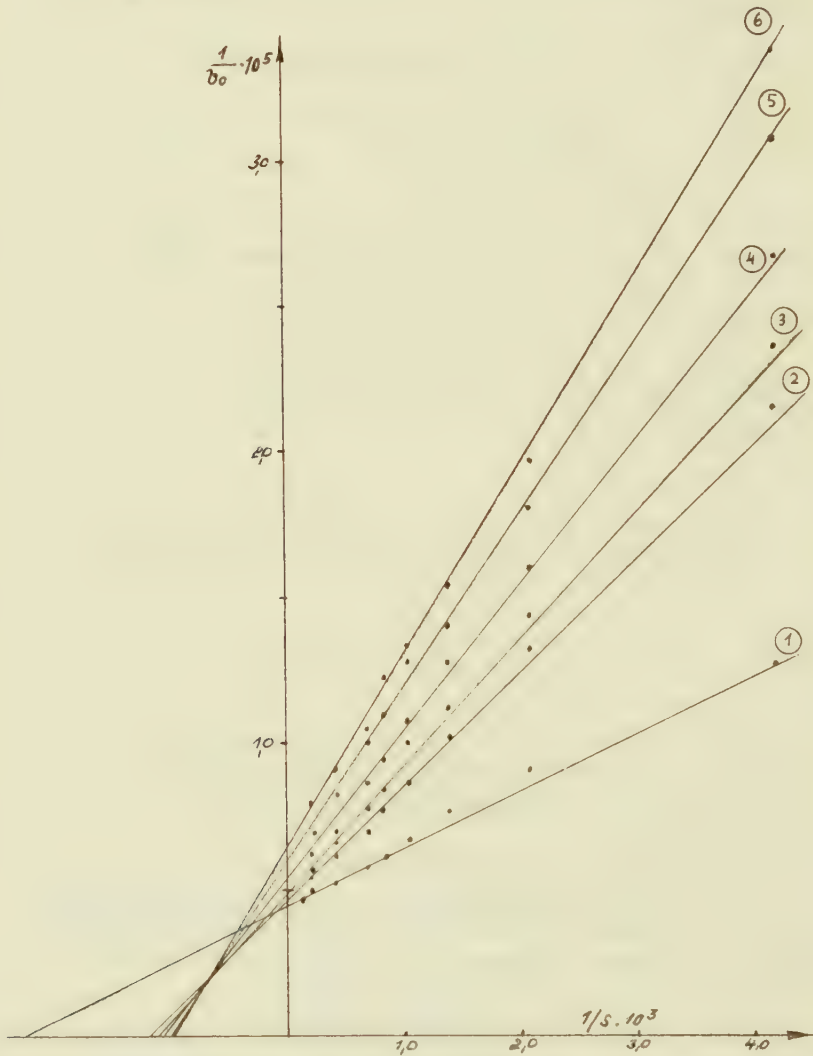
Kurve 2: Cholinchlorid + $3.04 \cdot 10^{-3}$ Mol/l Neurinchlorid

Kurve 3: Cholinchlorid + $25.7 \cdot 10^{-3}$ Mol/l Neurinchlorid.

Abszisse: Substratkonzentration Mol/l $\cdot 10^{-3}$

Ordinate: Anfangsgeschwindigkeit $v_0 \cdot 10^{-5}$.

Abb. 12: LINEWEAVER-BURK-Gerade für die Cholindehydrogenase ohne und mit Neurinzusatz.



Gerade 1: Ohne Inhibitor; Gerade 2: $3.04 \cdot 10^{-3}$ Mol/l Neurin-Cl;
 Gerade 3: $6.2 \cdot 10^{-3}$ Mol/l Neurin-Cl; Gerade 4: $11.85 \cdot 10^{-3}$ Mol/l Neurin-Cl;
 Gerade 5: $19.75 \cdot 10^{-3}$ Mol/l Neurin-Cl; Gerade 6: $25.7 \cdot 10^{-3}$ Mol/l Neurin-Cl.

Aus den Geraden und aus der Berechnung nach der Formel

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{K'}{V_{\max}}$$

ergaben sich die in Tabelle 5 aufgeführten Werte für $V_{\max}$ und K' .

Aus den Abbildungen 11 und 12 geht eindeutig hervor, dass es sich bei der Hemmung der Cholindehydrogenase durch Neurin weder um eine rein kompetitive noch um eine rein nicht-kompetitive Hemmung handelt.

c) Diskussion der Versuchsergebnisse

Die experimentellen Ergebnisse bestätigen eine allgemeine Inhibition der Cholindehydrogenase durch quartäre Ammoniumsalze. Bei sämtlichen untersuchten Verbindungen fand sich eine typische Hemmwirkung, die deutlich über die durch normale Salzeffekte hervorrufbare Hemmung hinausgeht. Bei diesen Verbindungen mit funktionellen Gruppen im Molekül ist die Art der Substituenten im quartären Ammoniummolekül mitbestimmend für die Hemmwirkung.

Tab. 4: Einfluss der Substituenten von quartären Ammoniumsalzen auf die Cholinoxydation

$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{R}_3 \\ \diagdown \quad / \\ \text{N} \\ / \quad \diagdown \\ \text{CH}_3 \quad \text{R}_4 \end{array}$	R_3	1	2	3
		- $\text{CH}_2 - \text{CH}_2\text{OH}$	- $\text{CH}=\text{CH}_2$	- $\text{CH}_2 - \text{CH}_2\text{Br (Cl)}$
$\begin{array}{c} \\ \text{Abnehmende} \\ \\ \text{Hemmwirkung} \\ \downarrow \end{array}$	R_4	- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	- CH_3	- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$
		- CH_2COOH	- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
		- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$		- CH_3
		- $\text{CH}=\text{CH}_2$		

In Tabelle 4 sind die untersuchten quartären Ammoniumsalze in der Reihenfolge ihrer Hemmwirkung auf die Cholinoxydation durch die Cholindehydrogenase zusammengestellt; die Verbindungen wurden nach Art ihrer Substituenten den Klassen, 1 mit β -Hydroxyäthylgruppe im Molekül, 2 mit Doppelbindung im Molekül und 3 mit β -Halogengruppe im Molekül zugeordnet. R_3 gibt den unter 1-3 aufgeführten Substituenten an, R_4 den weiteren Substituenten.

Bei den Verbindungen mit β -Hydroxyäthylgruppe im Ammoniummolekül muss noch eine aus den Versuchsbedingungen herrührende Fehlermöglichkeit berücksichtigt werden. Die Ammoniumsalze wurden mit der Mitochondrien-suspension vor der Cholinzugabe 12 Minuten lang inkubiert. Diese durch die Cholindehydrogenase oxydierbaren Substanzen wurden während dieser Zeit bereits zum Teil zur Stufe des Aldehyds oxydiert. Betainaldehyd wirkt aber, wie bereits angeführt, stark hemmend auf den weiteren Umsatz von Cholin, was von verschiedenen Forschern und auch von uns durch Untersuchungen mit Betainaldehyd bestätigt wurde. Für die aus den obigen Stoffen gebildeten Aldehyde darf sicherlich eine analoge Hemmwirkung angenommen werden, welche vor allem bei den von der Cholindehydrogenase in hohem Masse oxydierbaren Verbindungen.



erheblich ins Gewicht fallen dürfte. Unter Berücksichtigung dieses Effektes wird die oben unter 1 gegebene Hemmreihe wohl richtiger durch die Reihe



ersetzt werden.

Die Deutung der Hemmwirkung quartärer Ammoniumsalze auf die Aktivität der Cholindehydrogenase ist schwierig. MANN (Lit. 4) zog aus der Tatsache, dass NH_4^+ , $HN(CH_3)_3^+$ und Betain die Cholinoxydation hemmten, den Schluss, dass die Gruppe $-NR_3^+$ ($R = -H, -CH_3$) von primärer Wichtigkeit für den Angriff des Enzyms auf das Substrat sei. Inwieweit diese Annahme den tatsächlichen Gegebenheiten entspricht, ist fraglich.

Um die bei der kolorimetrischen Methode erhaltenen Daten möglichst quantitativ bezüglich der Hemmweise des Neurins auf die lösliche Cholindehydrogenase auswerten zu können, mussten verschiedene Postulate gemacht werden. Zunächst wird vorausgesetzt, dass die Reaktion streng dem Fermentmechanismus nach MICHAELIS-MENTEN gehorcht, wobei in weiterer Einschränkung (ES) (Enzym-Substrat-Komplex) in einer Stufe zerfallen soll. Ausserdem soll das Neurin nur den Ansatzpunkt des Cholins beeinflussen und nicht den Ansatzpunkt des Wasserstoffacceptors.

Als Arbeitshypothese wurde angenommen, dass es sich bei der beobachteten Hemmwirkung um eine Überlagerung von kompetitiver und nicht-kompetitiver (Verdrängungs-) Hemmung handeln könnte, wobei dahingehend vereinfacht wurde, dass diese beiden Hemmungen sich gegenseitig nicht beeinflussen.

Die Geradengleichung nach LINEWEAVER-BURK

$$\frac{1}{v} = \frac{K}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (1)$$

geht bei nicht-kompetitiver Hemmung über in die Gleichung:

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{K}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}} \right) \left(1 + \frac{I}{K_n} \right) \quad (2a)$$

Diese Gleichung kann, da

$$\frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{I}{K_n} \right) = \frac{1}{V_{i\max}} \quad ,$$

vereinfacht werden zu

$$\frac{1}{v} = \frac{K}{V_{i\max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{i\max}} \quad (2b)$$

Bei kompetitiver Hemmung erhält Gleichung (1) die Form:

$$\frac{1}{v} = \frac{K}{V_{\max}} \left(1 + \frac{I}{V_k} \right) \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (3a)$$

Diese Gleichung kann, da die scheinbare MICHAELIS-Konstante K' gleich

$$K' = K \left(1 + \frac{I}{K_k} \right)$$

ist, übergeleitet werden in die Form

$$\frac{1}{v} = \frac{K'}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (3b)$$

In den Gleichungen bedeuten: K = Dissoziationskonstante des Enzym-Substrat-Komplexes (ES); v = Geschwindigkeit; $V_{\max}$ = maximale Geschwindigkeit bei unendlicher Substratkonzentration; I = Inhibitorkonzentration; S = Substratkonzentration; K_n = Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes bei nicht-kompetitiver Hemmung; K_k = Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes bei kompetitiver Hemmung. Die Indices n , k , und g beziehen sich auf nicht-kompetitive, kompetitive und gefundene Hemmung.

Schematisch sind diese drei Geraden-Typen in Abb. 13 dargestellt. Die Gleichung der Geraden 3 trifft bei $\frac{1}{S} = 0$ ($S = \infty$) die normale Gerade (Gleichung (1)) bei $\frac{1}{V_{\max}}$, während die Gerade von Gleichung (2) bei $\frac{1}{V_{\max}}$ schneidet, d.h. man erhält bei unendlicher Substratkonzentration nur eine Hemmung nicht-kompetitiver Art.

Betrachtet man in der Abb. 14, in der nach der Gleichung für die gefundene Hemmungs-Gerade G_1 und nach Gleichungen für kompetitive und nicht-kompetitive Hemmung gesucht werden, diesen ausgezeichneten Punkt

$$\frac{1}{S} = 0; \quad \frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}}$$

(P in Abb. 14), so erkennt man, dass sich von diesem Punkt aus die Gerade für die an dieser Stelle allein vorhandene nicht kompetitive Hemmung ziehen lässt; denn die Steigung der Gerade

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{K}{V_{\max}}$$

ist bekannt, da $V_{\max}$ sich aus dem Wert für $\frac{1}{V_{\max}}$ ergibt und die Konstante K aus der Gleichung (1) der Normalgerade (G_2 in Abb. 14) hervorgeht. Somit ist die Gleichung (2a) für die nicht kompetitive Hemmung in diesem speziellen Falle ermittelt (G_3 in Abb. 14).

Vergleicht man diese Gerade G_3 und die gefundene Gerade G_1 (Abb. 14) mit den beiden Geraden 1 und 3 im Schaubild 13, so erkennt man, dass sich die Geraden G_1 und 3 nur durch einen Faktor in der Steigung von den Geraden G_3 und 1 unterscheiden; d.h. beide sind in Bezug auf die niederer liegenden Geraden vom Typus der kompetitiven Hemmung. Da der Faktor für die kompetitive Hemmung

$$f = 1 + \frac{1}{K_k}$$

lautet, geht somit Gleichung (2b) (entsprechend G_3) über in die Gleichung:

$$\frac{1}{v} = \frac{K}{V_{\max}} \left(1 + \frac{1}{K_k} \right) \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (4b)$$

bzw. Gleichung (2a) in die Gleichung

$$\frac{1}{v} = \left[\frac{K}{V_{\max}} \left(1 + \frac{1}{K_k} \right) \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}} \right] \left(1 + \frac{1}{K_n} \right) \quad (4a)$$

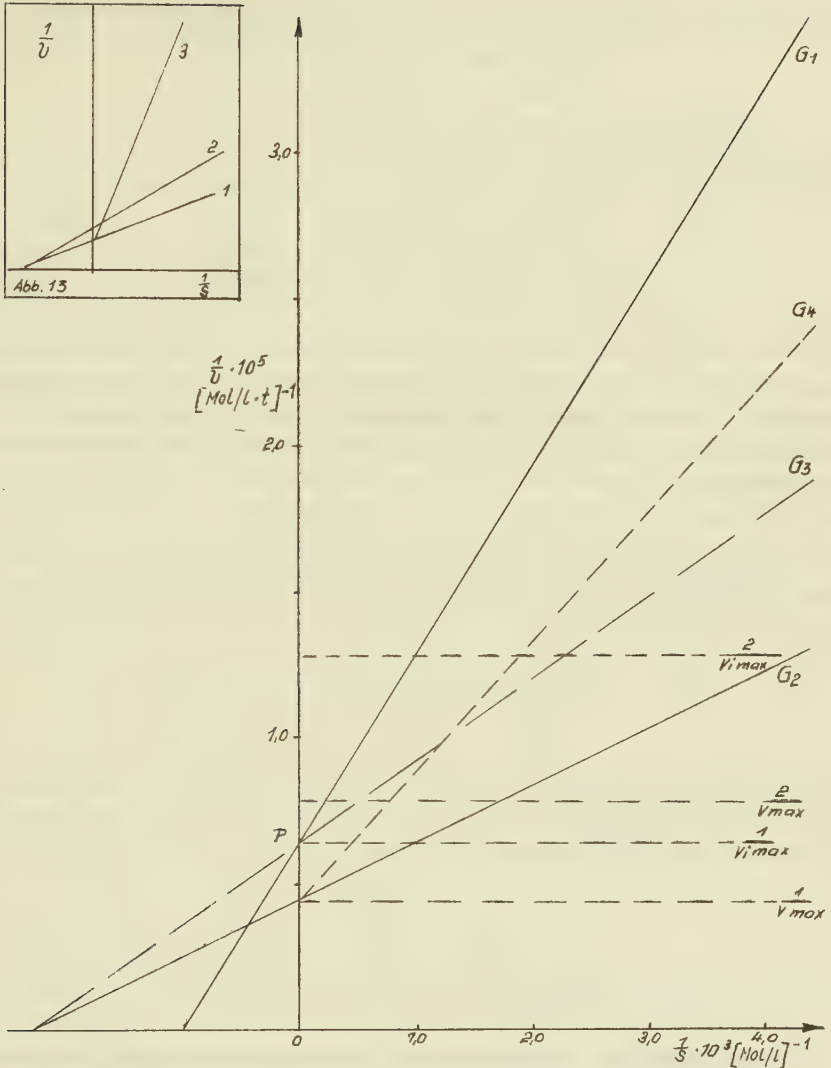


Abb. 13: Schematische Darstellung der Geraden nach LINEWEAVER-BURK:

- 1 = ohne Hemmung; 2 = nicht-kompetitive Hemmung;
- 3 = kompetitive Hemmung.

Abb. 14: Auflösung einer gemessenen LINEWEAVER-BURK-Geraden in nicht-kompetitive und kompetitive Hemmung.

G1: beobachtete Gerade bei Zusatz von $25.7 \cdot 10^{-3}$ Mol/l Neurin;

G2: beobachtete Gerade ohne Neurinzusatz;

G3: ermittelte Gerade für nicht-kompetitive Hemmung;

G4: ermittelte Gerade für kompetitive Hemmung.

Diese Gleichungen (4a) und (4b) lassen sich bei Verwendung des Ausdrucks

$$K_g = \frac{K_k \cdot K_u}{K_n + K_k + I} \quad (5)$$

überführen in die Gleichung:

$$\frac{1}{v} = \frac{K}{V_{\max}} \left(1 + \frac{I}{K_g}\right) \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (4c).$$

Die Ausdrücke (4a), (4b) und (4c) stellen die Gleichungen für die Überlagerung einer kompetitiven mit einer nicht-kompetitiven Hemmung dar, wobei nur die Frage noch zu klären bleibt, ob die Grösse der Inhibitorkonzentration in einen kompetitiven Anteil und einen nicht-kompetitiven Anteil zerlegt werden muss. Die Überlegung zeigt aber, dass, da beide Hemmtypen von der Inhibitorkonzentration abhängig sind, I in beiden Fällen gleich sein muss.

Zur Ermittlung der Geraden-Gleichung für die kompetitive Hemmung bedient man sich am besten der Gleichung (4b), worin sich die Steigung der Geraden aus den Gliedern:

$$\operatorname{tg} \alpha_g = \frac{K}{V_{\max}} \left(1 + \frac{I}{K_k}\right) = \operatorname{tg} \alpha_n \left(1 + \frac{I}{K_k}\right)$$

zusammensetzt. Man kennt nach obiger Auflösung den Absolutwert des Klammerausdrucks und da I bekannt ist, lässt sich die Grösse K_k errechnen. Man erhält so die Gleichung für die kompetitive Hemmung:

$$\frac{1}{v} = \frac{K}{V_{\max}} \left(1 + \frac{I}{K_k}\right) \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}} .$$

Diese Gerade ist in Abb. 14 als G4 bezeichnet.

In Abb. 14 wurde der Übersichtlichkeit halber nur die Zerlegung der Gerade G1 in kompetitive und nicht-kompetitive Hemmung aufgenommen. Diese Gerade wurde aus den bei der höchsten verwendeten Neurinkonzentration ($25.7 \cdot 10^{-3}$ Mol/l) erhaltenen Messdaten aufgestellt. Auch die bei den niederen Konzentrationen an Neurin erhaltenen Geraden (vgl. Abb. 12) wurden nach dem gleichen Schema zerlegt und ergaben die in den Tabellen 5 und 6 aufgeführten Werte.

Tab. 5: Daten zu den gemessenen LINEWEAVER-BURK-Geraden für verschiedene Neurinkonzentrationen

	Inhibitorkonzentration Mol/l · 10 ³					
	0	3.04	6.20	11.85	19.75	25.70
K _m bzw. K' Mol/l · 10 ⁴	4.35	8.35	8.78	9.17	9.8	10.1
V _{max} bzw. V _{imax} Mol/l · t · 10 ⁵	2.25	2.15	2.03	1.86	1.68	1.56
K _g Mol/l · 10 ³	-	0.849	0.90	0.98	1.0	0.99

Tab. 6: Daten zu den ermittelten Geraden für die nicht-kompetitive und kompetitive Hemmung bei verschiedenen Neurinkonzentrationen

Nicht kompetitive Hemmung	Inhibitorkonzentration Mol/l · 10 ³					
	0	3.04	6.20	11.85	19.75	25.70
K _m = K _n Mol/l · 10 ⁴	← 4.35 →					
V _{max} bzw. V _{imax} Mol/l · t · 10 ⁵	2.25	2.15	2.03	1.86	1.68	1.56
Kompetitive Hemmung						
K' Mol/l · 10 ⁴	4.35	8.35	8.78	9.17	9.8	10.1
V _{max} Mol/l · t · 10 ⁵	← 2.25 →					
K _k Mol/l · 10 ³	-	0.88	0.917	0.953	1.0	1.06

Trägt man die für die Versuchsergebnisse resultierenden Werte für K' und K gegen I auf (Abb. 15), so erhält man zwei Gerade, von denen die untere (1) der nicht-kompetitiven Hemmung entspricht, während die obere (2) die gefundene Hemmung darstellt.

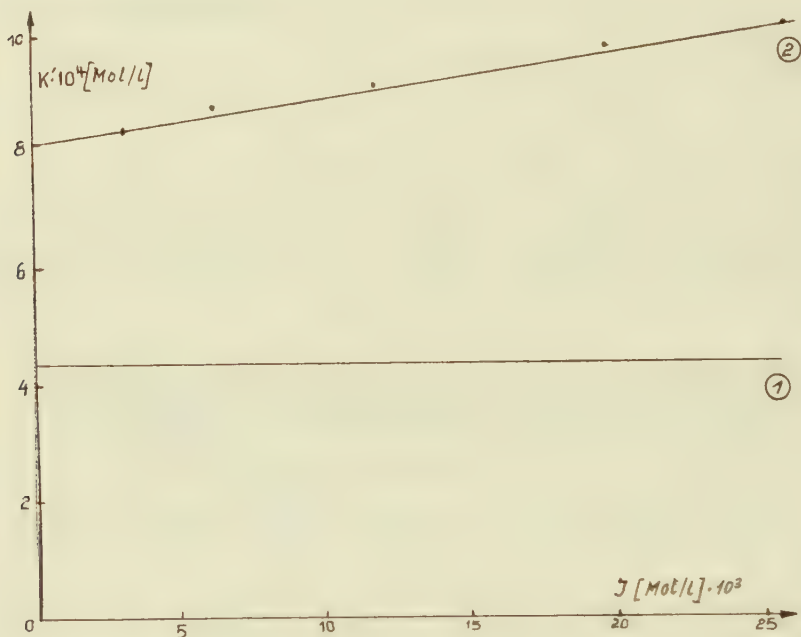


Abb. 15: K' als Funktion von I

1: Nicht-kompetitive Hemmung; 2: Gefundene Hemmung.

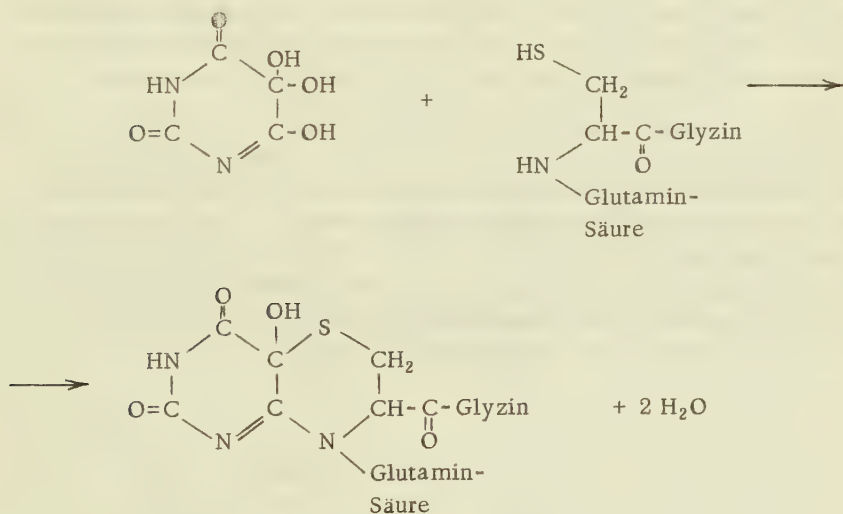
Aus der Steigung der Geraden ergibt sich K_k zu $1.02 \cdot 10^{-3} \text{ Mol/l}$, ein Wert, der mit den in Tabelle 6 ersichtlichen gut übereinstimmt.

Zusammenfassend kann man die bei Neurinzusatz auftretenden Hemmeffekte als Überlagerung von einer kompetitiven und einer nicht-kompetitiven Hemmung auffassen, wenn auch bei niederen Inhibitor-Konzentrationen Abweichungen auftreten. Diese werden wohl durch die gegenseitige Beeinflussung der beiden Hemmtypen zustande kommen.

IV. Der Einfluss von Glutathion auf die Cholindehydrogenase

Nach den Arbeiten von BARRON u. SINGER (Lit. 34), CAFIERO (Lit. 35) und ROTHSCHILD und Mitarbeitern (Lit. 36) scheint es, dass die Cholindehydrogenase zu den Enzymen gezählt werden muss, deren aktive Gruppe eine Sulfhydrylgruppe, wie z.B. bei der Succindehydrogenase, der Glyoxalase oder Crotonase, ist. Die obigen Autoren untersuchten durchwegs den Einfluss von -SH-Reagenzien (p-Chlormercuribenzoat, o-Jodosobenzoat, Alloxan, Arsenit usw.) auf die Cholindehydrogenase und schlossen aus der starken Inhibitionswirkung dieser Verbindungen auf das Vorhandensein von Sulfhydrylgruppen in der prosthetischen Gruppe der Cholindehydrogenase.

Das bestuntersuchte Beispiel für diese Fermentklasse mit Sulfhydrylgruppe ist wohl die Glyoxalase, von der bekannt ist, dass ihre prosthetische Gruppe das Glutathion enthält (Lit. 51-54). Zugabe von Glutathion in seiner reduzierten Stufe (GSH) führte zu erheblichen Steigerungen des Umsatzes bei den oben angeführten Fermenten. In anderen Arbeiten wurde gezeigt, dass Glutathion auch im Alloxankomplex eine wichtige Rolle spielt (Lit. 55-59). LAZAROW (Lit. 60) stellte für die Reaktion zwischen Alloxan und Glutathion folgende Gleichung auf:



Die Möglichkeit einer Beziehung zwischen Glutathion – oder auch nur der Sulfhydrylgruppe des Glutathions – zu der Carbonylgruppe, wie sie bei Glyoxal und bei Alloxan (Lit. 61) angenommen wird, veranlasste uns, den Einfluss von

GSH auf die Cholindehydrogenase, welche ja die Oxydation von der Carbinolgruppe des Cholins zur Carbonylgruppe des Betainaldehyds vermittelt, zu untersuchen. Es müsste bei Vorhandensein eines Sulfhydrylrestes in der aktiven Gruppe des Ferments, zumindest bei geringen Konzentrationen an zugesetztem GSH, eine Aktivierung der Cholindehydrogenase eintreten, bei Reaktion des GSH mit der neugebildeten Carbonylgruppe der Umsatz an Cholin deutlich zunehmen.

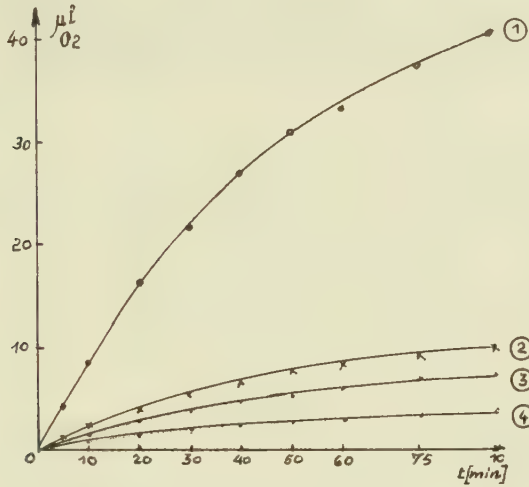
a) Untersuchung des Einflusses von Glutathion-red.
auf die Aktivität der Cholindehydrogenase

Die Versuche mit Glutathion in seiner reduzierten Stufe (GSH) wurden in der Weise durchgeführt, dass zu den normalen Cholinatmungsansätzen GSH in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt wurde und der Sauerstoffverbrauch in der Warburg-Apparatur während der Versuchsdauer von 90 Minuten verfolgt wurde. Aus den erhaltenen Werten, sowie den Vergleichswerten mit und ohne Glutathion- und mit und ohne Cholinzusatz wurden die relativen Veratmungsquoten bestimmt.

Abb. 16 zeigt als Beispiel die Ergebnisse eines solchen Versuchsansatzes. Verwendet wurde eine Konzentration an Cholinchlorid von $1.15 \cdot 10^{-2}$ Mol/l. Die Glutathion-red-Konzentrationen betrugen $2.6 \cdot 10^{-3}$, $5.2 \cdot 10^{-3}$ und $10.4 \cdot 10^{-3}$ Mol/l. Es wurde eine von der Konzentration des GSH abhängige Hemmwirkung gefunden. Die Kurven 2, 3 und 4 zeigen durchwegs eine Symbasie zu Kurve 1, der reinen Cholinveratmung, was auf eine über den gesamten Versuchszeitraum gleichbleibende Wirkung des GSH auf die Cholindehydrogenase hinweist.

In Tabelle 7 sind die Mittelwerte der Versuchsreihen zusammengefasst, bei denen bei konstantem Zusatz von 0.1 ml einer 4proz. wässrigen Lösung von Cholinchlorid (= 4 mg) verschiedene Konzentrationen GSH (Glutathion-red., Boehringer, Mannheim) den Ansätzen zugefügt wurden. Es wird der Sauerstoffverbrauch angeführt, vermindert um den Wert, den man aus Grundansatz + GSH erhielt. Es ergab sich mit steigender Menge GSH ein Abfall des Sauerstoffverbrauchs, der bereits bei einer Konzentration an GSH von $10.4 \cdot 10^{-3}$ Mol/l nur mehr 8% des normalen Sauerstoffverbrauchs ausmachte.

Abb. 16: Cholinoxydation bei Zusatz von verschiedenen GSH-Konzentrationen



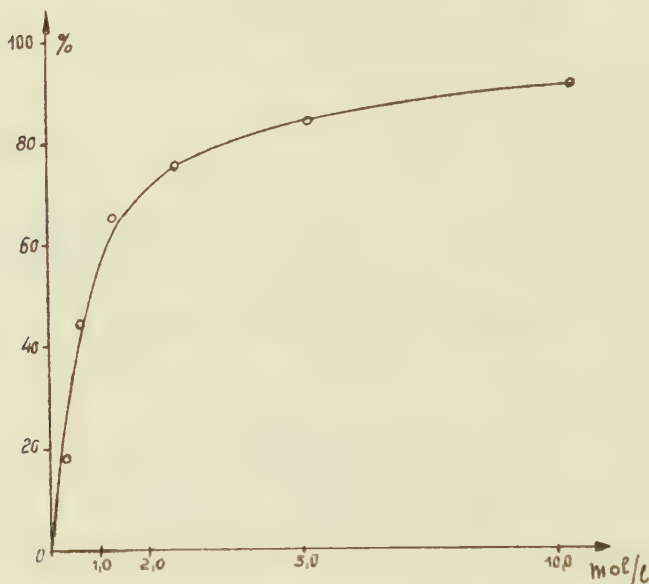
Kurve 1: 4 mg Cholin ohne Zusatz;
 Kurve 2: 4 mg Cholin + 2 mg GSH;
 Kurve 3: 4 mg Cholin + 4 mg GSH;
 Kurve 4: 4 mg Cholin + 8 mg GSH.

Tab. 7: Aktivität der Cholindehydrogenase bei Zusatz von GSH

Konz. GSH Mol/l · 10 ³	n	O ₂ -Verbrauch Mittelwert μl	Mittlere Abweichung $\sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum x^2}{n}}$	Hemmung %
0.0	21	40.9	± 1.7	0.0
0.325	6	33.1	± 1.5	18.6
0.65	6	22.6	± 1.2	44.6
1.3	6	14.2	± 1.0	65.2
2.6	10	9.8	± 1.0	76.0
5.2	10	6.5	± 0.9	84.1
10.4	4	3.2	± 0.5	92.0

Die Mittelwerte der in der obigen Tabelle zusammengefassten Versuche sind in Abb. 17 graphisch dargestellt.

Abb. 17: Hemmung des Sauerstoffverbrauchs bei der Cholinoxydation durch die Cholindehydrogenase bei GSH-Zusatz



Abszisse: GSH-Konzentration Mol/1·10³

Ordinate: Hemmung (%)

Da die Hemmwirkung des GSH auch auf seine Eigenschaft, Komplexverbindungen mit Schwermetallen zu bilden, zurückgeführt werden kann, wurde eine Reihe von Hemmversuchen mit Zusatz von FeCl₂, FeCl₃ und CuCl₂ angesetzt, wie auch einige Versuche mit zusätzlichem Cytochrom c. Einige Ergebnisse werden in Tabelle 8 gebracht.

Die Hemmung der Cholinoxydation durch GSH lässt sich durch geringe Mengen Schwermetallsalze (Fe^{II}, Fe^{III}, Cu^{II}) nicht beeinflussen, erst bei Konzentrationen an Fe^{II} und Cu^{II}, die in der Grösse der Glutathionkonzentration liegen, tritt ein erheblicher Anstieg der Atmung ein. Auch die Menge an zugesetztem Cytochrom c scheint die Oxydation zu beeinflussen.

Da Dichlorphenolindophenol durch GSH reduziert wird, konnten keine Versuche mit löslicher Cholindehydrogenase angestellt werden.

Tab. 8: Beeinflussung der Glutathionhemmung durch Schwermetallsalze und Cytochrom c

Cholin-Cl mg	GSH mg	Zusatz mg	O ₂ -Verbrauch μl
4	-	-	41.3
4	4	-	7.0
4	4	0.4 Fe ⁺⁺	7.3
4	4	4.0 Fe ⁺⁺	30.0
4	4	0.4 Fe ⁺⁺⁺	8.0
4	4	0.4 Cu ⁺⁺	7.5
4	4	4.0 Cu ⁺⁺	38.2
-	4	2.5 Cyt. c	10.2
4	1	2.5 Cyt. c	36.2
4	4	2.5 Cyt. c	31.0
4	8	2.5 Cyt. c	10.2

b) Diskussion der Versuchsergebnisse

Nach unseren Versuchsergebnissen ruft der Zusatz von GSH in vitro einen starken Abfall der Aktivität der Cholindehydrogenase hervor. Die Ursache für die beobachtete starke Hemmung von GSH auf die Cholin oxydation darf wohl nicht in einer Schwermetallblockierung des Ferments durch das Glutathion vermutet werden, da in diesem Falle bereits durch Zusatz geringer Dosen an Schwermetallsalzen eine deutliche Aufhebung der Hemmwirkung erzielt werden müsste; bei den Untersuchungen erfolgte aber keine wesentliche Veränderung in der Grösse der Veratmung. Die weitgehende Aufhebung der Glutathionwirkung bei Zusatz von grösseren Konzentrationen an FeCl₂ oder CuCl₂ kann zwanglos auf die Komplexbildung des Glutathions mit den zugesetzten Metall-Ionen und die daraus entstehende Blockierung des Glutathions zurückgeführt werden.

Für die bei Vorhandensein von SH-Gruppen im Ferment zu erwartende Wechselbeziehung zwischen der SH-Gruppe des Glutathions und der der prosthetischen Gruppe des Ferments konnten keine Anhaltspunkte erbracht werden. Hierbei hätte, zumindest bei geringen Konzentrationen an GSH, eine Aktivitätssteigerung des Ferments beobachtet werden müssen, und erst bei höheren GSH-Konzentrationen hätten Toxizitätseffekte erwartet werden können. Bei allen untersuchten Konzentrationen lässt sich jedoch eine starke und über den gesamten Versuchszeitraum gleichverlaufende Inhibition der Cholindehydrogenase

durch GSH erkennen, ein Ergebnis, welches das Vorhandensein von SH-Gruppen in der prosthetischen Gruppe der Cholindehydrogenase nicht bestätigt. Ob und in welcher Konzentration das Glutathion während der Versuchsdauer in der reduzierten Stufe vorlag, kann bei unserer Versuchsanordnung nicht entschieden werden.

Verschiedene Forscher (Lit. 34-36) führen die beobachtete Hemmwirkung von SH-Reagenzien (p-Chlormercuribenzoat, o-Jodosobenzoat, Alloxan, Arsenit usw.) auf die Aktivität der Cholindehydrogenase auf eine Blockierung der SH-Gruppen des Ferments zurück. Daneben ist auch die Möglichkeit gegeben, dass bei der bekannten Empfindlichkeit der Cholindehydrogenase gegen die verschiedensten Verbindungsklassen eine Inhibitionswirkung anderer Art vorliegt; eine endgültige Entscheidung in dieser Frage ist schwer zu treffen.

Die starke Hemmwirkung des GSH spricht auch gegen eine Reaktion zwischen der Carbonylgruppe des Betainaldehyds und der SH-Gruppe des Glutathions. Durch eine derartige Reaktion, sei es eine Reaktion in der Art der von LAZAROW (Lit. 60) angenommenen Kondensationsreaktion oder eine Additionsreaktion analog einer Aldehydsulfhydrat-Bildung, würde sich das Gleichgewicht durch die Entfernung des Betainaldehyds aus dem System zugunsten einer Umsatzsteigerung verschieben, was aber nach den Versuchsergebnissen nicht der Fall ist.

Der Ansatzpunkt des Glutathions muss daher bei unserem System bei einem anderen Glied des Enzymkomplexes gesucht werden. Die Hemmwirkung des GSH dürfte am ehesten durch die Störung einer Stufe in dem mit der Cholindehydrogenase zusammenhängenden Wasserstofftransportsystem zu deuten sein, worauf auch die Beeinflussbarkeit der Glutathionhemmung durch wechselnde Cytochrom-c-Mengen hinweist.

V. Der Einfluss von Thyroxin auf die Cholindehydrogenase

Seit langem bekannt ist die Erhöhung des O_2 -Umsatzes von Lebergewebe bei Ratten, denen oral oder parenteral Thyroxin verabreicht wurde. Von den zahlreichen Veröffentlichungen darüber seien nur die Arbeiten von DRESES (Lit. 62), NIEMANN u. MEAD (Lit. 63) u. GORDON u. HEMING (Lit. 64) erwähnt. Von verschiedenen Forschern (Lit. 65-71) wird dem Thyroxin in ähnlicher Weise die Fähigkeit zur Entkoppelung der oxydativen Phosphorylierung zugeschrieben wie dem 2,4-Dinitrophenol, dessen stoffwechselsteigernde Wirkung nach LIPMANN (Lit. 72) u. GREEN (Lit. 73) auf Entkoppelung von Atmung und oxydativer Phosphorylierung zurückgeführt wird.

Im Zusammenhang mit der Entkoppelung von Atmung und oxydativer Phosphorylierung interessierte uns der Einfluss von Thyroxin auf die Cholindehydrogenase.

Die Wirkung von Thyroxin wurde bei verschiedenen Enzymen bereits untersucht. Thyroxin- oder Thyreoidea-Gaben riefen bei der Cytochrom-Oxydase (Lit. 74-76), der Succindehydrogenase (Lit. 75-78) und der d-Aminosäure-Oxydase (Lit. 79) eine Steigerung der Aktivität, dagegen bei der Lacticodehydrogenase (Lit. 80) der Rattenleber einen Abfall der Aktivität hervor.

a) Untersuchung des Einflusses von Thyroxin auf die Veratmung von Cholin

Zum Studium des Einflusses von Thyroxin auf die Cholinehydrogenase wurden Untersuchungen in vivo und in vitro angestellt. Wie früher schon erwähnt wurde, können die in vitro gewonnenen Versuchsergebnisse allein leicht zu einer Verzerrung der Modellvorstellung für die in vivo vorliegenden Verhältnisse führen. Durch den Vergleich von in vivo- und in vitro-Ergebnissen lassen sich Ansatzpunkte für ein differenzierteres Bild über den Ablauf des Geschehens im Organismus erwarten.

1.) Untersuchungen in vivo.

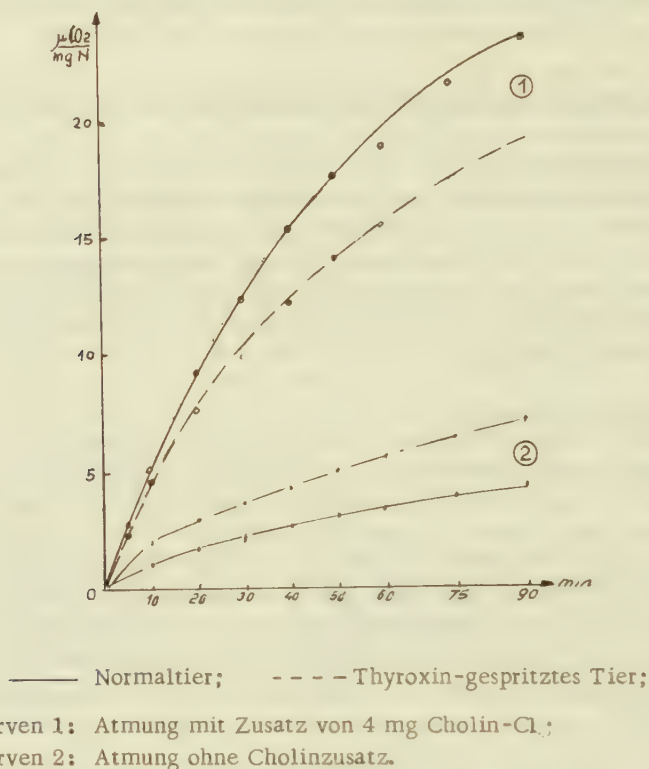
Bei den Untersuchungen in vivo wurden männliche Ratten eines Inzuchtstammes, die mit normalem Futter ernährt waren, verwendet. Von zwei vergleichbaren Tieren wurde bei einem D, L-Thyroxin ⁺⁾ subcutan gespritzt, während das andere als Kontrolltier diente. Die weiterhin gleich gehaltenen Tiere wurden nach bestimmter Zeit dekapitiert und aus der Leber unter gleichen Bedingungen die Mitochondrienpräparate dargestellt. Die beiden Präparate wurden in üblicher Weise in der Warburg-Apparatur angesetzt und der Sauerstoffverbrauch über einen Zeitraum von 90 Minuten verfolgt. Um aufeinander beziehbare Werte zu erhalten, wurde bei jedem Mitochondrienpräparat eine Stickstoffbestimmung nach KJELDAHL vorgenommen und die beobachteten O₂-Werte auf ein mg N/Gramm Rohleber umgerechnet.

Abb. 18 gibt einen solchen Versuchsansatz wieder. Es werden Mitochondrienpräparate von einem Normaltier und einem Tier, dem 8 mg D, L-Thyroxin subcutan gegeben worden waren, und das 89 Stunden nach der Injektion getötet worden war, verglichen.

In Tabelle 9 sind die erhaltenen Versuchsergebnisse für diese Versuchsreihen zusammengestellt. In Spalte 1 ist die Zahl der mit Thyroxin behandelten Ratten, in Spalte 2 die D,L-Thyroxin-Dosis in mg und in Spalte 3 die zwischen Injektion und Tötung verstrichene Zeit in Stunden angegeben.

⁺⁾ Für die freundliche Überlassung der Versuchsmengen D,L-Thyroxin sei der Deutschen Hoffmann-la Roche AG, Grenzach, auch an dieser Stelle bestens gedankt.

Abb. 18: O_2 -Verbrauch von Lebermitochondrien mit und ohne Cholinzusatz



Die Werte in den Spalten 4 bis 7 sind Mittelwerte aus dem O_2 -Verbrauch in μl , bezogen auf den Stickstoffgehalt der Mitochondrien. Die Spalten 4 und 5 zeigen den Sauerstoffverbrauch bei Veratmung von 4 mg Cholinchlorid ($= 2.86 \cdot 10^{-5}$ Mol) abzüglich der Grundatmung, die in Spalte 6 und 7 aufgeführt ist. Die Grundatmung bezeichnet den Sauerstoffverbrauch der Mitochondriensuspension ohne Cholinzusatz. In Spalte 4 und 6 stehen die Mittelwerte der Kontrolltiere, in Spalte 5 und 7 die der Thyroxin-gespritzten Tiere. Die in Spalte 8 angeführten Werte für den relativen O_2 -Verbrauch bei der Cholinveratmung unter Verwendung von Mitochondrien injizierter Ratten wurden aus dem Vergleich mit den entsprechenden Normaltier-Werten ermittelt. Die Werte in Spalte 9 leiteten sich in gleicher Weise aus der Grundatmung von Normaltier und Thyroxin-Tier ab. In beiden Fällen wurde der Sauerstoffverbrauch der Normaltiere gleich 100 gesetzt.

Tab. 9: Einfluss von Thyroxin (subcutan) auf die Grundatmung und die Veratmung von Cholin bei Verwendung von Mitochondrien aus Rattenleber

1	2	3	4	5	6	7	8	9
n	mg Thy-ro-xin	Std.	Cholinveratmung $\mu\text{l O}_2/\text{mg N}$		Grundatmung $\mu\text{l O}_2/\text{mg N}$		Relative Akti-vität; Normaltier = 100	
			Normal-Ratte	Thyroxin-Ratte	Normal-Ratte	Thyroxin-Ratte	Cholin-dehydr.	Grund-atmung
2	12	65	19.6	19.2	3.9	4.6	98	118
2	12	66	19.6	19.2	3.9	3.7	98	97
2	12	113	18.7	14.0	3.8	4.5	75	119
2	12	161	19.7	10.0	4.0	6.1	51	152
2	8	52	20.2	10.2	4.4	7.0	50	159
2	8	89	19.3	11.5	4.3	7.2	60	168
2	8	137	19.8	18.5	4.3	8.1	93	188
2	8	187	21.3	20.3	5.1	5.0	96	98

Trotz der grossen Fehlerbreite und Streuung der Ergebnisse lässt sich bei diesen in-vivo-Versuchen eine Abnahme der Veratmung des Cholins durch die Cholindehydrogenase feststellen, sowie die Steigerung der Grundatmung der Lebermitochondrien, für die unter ähnlichen Versuchsbedingungen GORDON u. HEMING (Lit. 64) bei Verwendung von Rattenlebergewebe den Wert von 60 % angeben, einen Wert, dem auch unsere Ergebnisse entsprechen.

Im Rohgewicht der Leber zeigte sich bei Thyroxin-behandelten und normalen Ratten ein deutlicher Unterschied; die Leber der Thyroxin-Tiere wog durchwegs weniger als die der Vergleichstiere. Einige Werte werden in Tabelle 10 gebracht.

Tab. 10: Rohgewicht der Leber von normalen und Thyroxin-behandelten Ratten

n	injiziertes Thyroxin mg	Tötung nach Std.	Rohlebergewicht in Gramm	
			Normaltier	Thyroxintier
2	12	66	12.0	8.4
2	12	113	10.5	8.2
2	12	161	10.0	7.0
2	8	89	8.7	7.5
2	8	137	9.4	9.0
2	8	187	14.3	13.5

2.) Untersuchungen in vitro.

Nachdem bei direktem Zusatz von Thyroxin zu den Versuchsansätzen sich keine Wirkung bemerkbar machte, war es nötig, die Mitochondriensuspension mit Thyroxin längere Zeit zu inkubieren. Dazu wurde ein Teil der Mitochondrien in KREBS-RINGER-Lösung, welcher das D,L-Thyroxin in der gewünschten Menge zugesetzt worden war, suspendiert, während die zum Vergleich dienende andere Hälfte der Mitochondrien analog, aber ohne Thyroxinzusatz, behandelt wurde. Nach der Inkubationszeit wurden beide Suspensionen unter den gleichen Bedingungen abzentrifugiert und zweimal mit Puffer gewaschen. Die Versuche wurden in üblicher Weise angesetzt und der Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien mit und ohne Cholinzusatz bei sonst gleicher Versuchsanordnung über den Zeitraum von 90 Minuten beobachtet.

In Abb. 19 sind die Ergebnisse eines solchen Versuchsansatzes erfasst. Es wurde eine Mitochondriensuspension, die mit 4 mg D,L-Thyroxin (Thyroxinkonzentration in der Suspension = $1.47 \cdot 10^{-3}$ Mol/l) 17.5 Stunden lang inkubiert war, unter Zusatz von 4 mg Cholinchlorid (Konzentration des Cholinchlorids im Reaktionsgemisch = $1.15 \cdot 10^{-2}$ Mol/l) veratmet und mit der Atmung des nicht mit Thyroxin inkubierten Anteils verglichen.

Auch bei diesen Versuchen in vitro wurden die erhaltenen Sauerstoffwerte auf die – vor der Inkubation – ermittelten Stickstoffwerte der Mitochondriensuspensionen bezogen. Die Resultate dieser Versuchsreihen sind in Tabelle 11 zusammengestellt.



Abb. 19: O_2 -Verbrauch von Mitochondrien mit und ohne Cholinzusatz

— normale Suspension;
--- Suspension, die mit 4 mg Thyroxin inkubiert war.

Kurven 1: Atmung mit Zusatz von Cholinchlorid;

Kurven 2: Atmung ohne Cholinzusatz.

Tab. 11: Einfluss von Thyroxin (inkubiert) auf Grundatmung und Cholinveratmung bei Verwendung von Mitochondrien aus Rattenleber

1	2	3	4	5	6	7	8	9
n	mg Thyroxin	Inkub. Zeit Std.	Cholinveratmung $\mu\text{l O}_2/\text{mg N}$		Grundatmung $\mu\text{l O}_2/\text{mg N}$		Relative Veratmungsquote; ohne Thy. = 100	
			Mitoch. ohne Thy.	Mitoch. + Thy.	Mitoch. ohne Thy.	Mitoch. + Thy.	Cholinveratm.	Grundatmung
2	4	1	18.2	20.6	3.8	4.6	114	121
2	4	3.5	19.0	20.3	4.0	5.2	107	130
2	4	6	17.6	20.8	4.2	5.8	118	138
2	4	17.5	18.4	21.1	3.2	4.6	115	144
2	4	20.5	18.7	21.4	3.5	5.0	114	143
2	8	18	18.7	23.6	3.1	2.9	126	94
2	8	21	18.1	19.9	2.8	2.7	110	97
2	12	12	19.5	18.9	3.6	3.0	97	83
2	12	19.5	19.3	16.8	3.1	1.7	87	55

Die Tabelle 11 ist wie Tabelle 9 angeordnet. Die beiden Versuchsreihen unterscheiden sich dadurch, dass in Tabelle 11 die Versuchsergebnisse von Mitochondrien, welche mit Thyroxin inkubiert worden waren, aufgeführt sind, während zu den Versuchen von Tabelle 9 Mitochondrien von Thyroxin-gespritzten Tieren verwendet wurden. Spalte 3 gibt hier die Inkubationszeit in Stunden an; in Spalte 5 ist der Sauerstoffverbrauch von inkubierten Mitochondrien bei Cholinzusatz (4 mg Cholinchlorid), in Spalte 7 ohne Cholinzusatz eingetragen, während in den Spalten 4 und 6 die entsprechenden Vergleichswerte stehen. Die Werte der Spalten 8 und 9 leiten sich wie in Tabelle 9 aus dem Vergleich des Sauerstoffverbrauchs von inkubierten und normalen Mitochondrien her.

Wie aus den angeführten Versuchsdaten hervorgeht, stellt sich bei Inkubation der Mitochondrien mit geringen und mittleren Konzentrationen an Thyroxin eine Steigerung der Cholinveratmung durch die Cholindehydrogenase ein. Dagegen wird

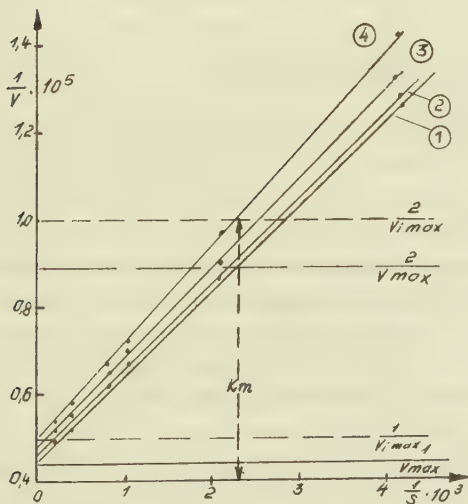
bei grösseren Dosen an Thyroxin eine Abnahme der Cholin oxydation erreicht. Es lässt sich eine Parallelität beim Einfluss des Thyroxins auf die Grösse der Cholinveratmung erkennen. Auch bei der Grundatmung bewirken kleine Dosen Thyroxin eine Steigerung, während bei höheren Konzentrationen eine Umkehr eintritt. Diese konzentrationsabhängige Wirkung ist, auch bei der Grundatmung, bei Thyroxin eine wohlbekannte Erscheinung.

b) Untersuchung der Wirkung von Thyroxin auf lösliche Cholin dehydrogenase

Auch von der Untersuchung der Wirkung des Thyroxins auf zellfreie Cholin dehydrogenase liessen sich aufschlussreiche Ergebnisse über den Ansatzpunkt des Thyroxins im Fermentsystem erwarten.

Die Versuche erfolgten in der Weise, dass ein Teil des Cholin dehydrogenase-Cholsäureextraktes mit D,L-Thyroxin bei 0°C 1 Stunde lang inkubiert wurde und danach die Reduktion von DPhI nach Cholinzusatz im inkubierten und im nicht-inkubierten Anteil unter sonst gleichen Bedingungen im Photometer verfolgt wurde.

Abb. 20: Gerade nach LINEWEAVER-BURK für Cholin dehydrogenase
ohne und mit D, L-Thyroxinzusatz



Gerade 1: ohne
Thyroxinzusatz

Gerade 2: mit
 $0.43 \cdot 10^{-4}$ Mol/l
Thyroxin;

Gerade 3: mit
 $2.13 \cdot 10^{-4}$ Mol/l
Thyroxin;

Gerade 4: mit
 $4.26 \cdot 10^{-4}$ Mol/l
Thyroxin.

Wie zuvor (siehe S. 9) wurden die Anfangsgeschwindigkeiten v_0 aus den Messdaten ermittelt. Aus den Resultaten gingen die in Abb. 20 gebrachten pS-Geraden nach LINEWEAVER-BURK hervor. Wie aus der Abbildung zu ersehen ist, ergab sich bei diesen hohen Thyroxindosen nur ein sehr geringer Abfall der Anfangsgeschwindigkeit v_0 . Nach der verschiedenen Höhe der Geschwindigkeit $V_{\max}$ bei unendlicher Substratkonzentration und nach der einheitlichen MICHAELIS-Konstante handelt es sich um eine nicht-kompetitive Hemmung.

Die aus der Abb. 20 entnommenen Werte für $V_{\max}$ und die nach der Gleichung

$$\frac{v}{v_i} = 1 + \frac{I}{K_i}$$

errechneten K_i -Größen sind:

$$K_i = 3.41 \cdot 10^{-3} \text{ [Mol/l];}$$

$$\begin{aligned} V_{\max} &= 2.21 \cdot 10^{-5} \left[\frac{\text{Mol}}{\text{l} \cdot \text{Min.}} \right] \text{ bei } 0.43 \cdot 10^{-4} \text{ Mol/l Thyroxin.} \\ &= 2.12 \cdot 10^{-5} \quad " \quad " \quad 2.13 \cdot 10^{-4} \quad " \quad " \\ &= 2.00 \cdot 10^{-5} \quad " \quad " \quad 4.26 \cdot 10^{-4} \quad " \quad " \end{aligned}$$

während $K_m = 4.35 \cdot 10^{-4} \text{ [Mol/l]}$ und $V_{\max} = 2.25 \cdot 10^{-5} \left[\frac{\text{Mol}}{\text{l} \cdot \text{Min.}} \right]$ beträgt.

c) Diskussion der Versuchsergebnisse

Bei den Untersuchungen über den Einfluss von Thyroxin auf die Veratmung des Cholins durch die Cholindehydrogenase wurden in vitro und in vivo relativ sehr hohe Dosen an Thyroxin verabreicht, die erheblich über den physiologischen Konzentrationen lagen. Ein Grund dafür lag in der verhältnismässig hohen Fehlerstreuung bei den Experimenten in vivo. Nur durch die Verwendung von grösseren Thyroxinkonzentrationen konnten sichere Versuchsergebnisse erwartet werden. Vor allem bei den Versuchen in vitro kann die anscheinend langsame Diffusion des Thyroxins in die Mitochondrien eine Rolle spielen, deren Ursache in der Grösse und dem im Grenzfall dreifachen Ladungszustand des Thyroxinmoleküls gesucht werden darf.

Auch ist die Ratte in Bezug auf Thyroxin ein wenig geeignetes Versuchstier, da von ihr das gegebene Thyroxin in ziemlich kurzer Zeit abgebaut und ausge-

schieden wird; nach KLITGAARD, LIPNER, BARKER u. WINNICK (Lit. 81) scheiden Ratten bereits nach 12 Stunden 31% des injizierten Thyroxins aus. Andererseits aber konnte bei dem hohen Gehalt der Rattenleber an Cholindehydrogenase der Effekt des Thyroxins auf diese am besten studiert werden. Zudem stehen bei Ratten die meisten Vergleichswerte über den Einfluss anderer Faktoren auf die Cholindehydrogenase zur Verfügung, da die überwiegende Mehrheit der Arbeiten über die Cholindehydrogenase mit Ratten als Versuchstieren ausgeführt wurde.

Die im weiteren Verlauf der Besprechung des öfteren auftretenden Begriffe „Aktivität der Cholindehydrogenase“ und „Inhibition der Cholindehydrogenase“ wurden nur mit der Einschränkung verwendet, dass eine genaue Lokalisierung des Eingreifens von Thyroxin in das gesamte Enzymsystem nicht mit absoluter Sicherheit erfolgen kann und daher die beobachtete Wirkung sowohl auf eine Störung in der Atmungskette als auch auf eine Blockierung der Cholindehydrogenase zurückgeführt werden kann, wobei beide Effekte das gleiche äussere Erscheinungsbild ergeben. Unter diesem Vorbehalt wurde der Einfachheit halber die Grösse des Sauerstoffverbrauchs bei den einzelnen Versuchsreihen der „Aktivität der Cholindehydrogenase“ gleichgesetzt.

Die Aktivität der Cholindehydrogenase der Mitochondrien aus Rattenleber wurde bei den Versuchen in vivo durch die subkutan gegebenen hohen Thyroxinmengen durchwegs herabgesetzt. Bei niedrigeren Konzentrationen an Thyroxin können bei Tiervergleichsversuchen aus den oben angeführten Gründen keine Aussagen gemacht werden. Dieser Aktivitätsabfall der Cholindehydrogenase deutet auf eine Schädigung des Enzymsystems, vielleicht aber auch des gesamten Leberapparates, hin, womit das verminderte Lebergewicht der injizierten Tiere in Zusammenhang gebracht werden kann. Da bei der länger dauernden Einwirkung des Thyroxins unübersichtliche Intoxikationswirkungen auftreten können, lassen sich jedoch aus den in vivo gewonnenen Versuchsergebnissen keine eindeutigen Schlüsse ziehen.

Ein Vergleich zwischen den in vitro mit Mitochondrien erhaltenen Ergebnissen und den mit isolierter Cholindehydrogenase erzielten Resultaten zeigt, dass bei der löslichen Cholindehydrogenase kaum ein Effekt erzielt wurde, dagegen bei der Cholindehydrogenase in Mitochondrien deutliche Wirkungen auftraten. Unserem Erachten nach ist dies eine Bestätigung dafür, dass der Ansatzpunkt des Thyroxins nicht am Enzym Cholindehydrogenase sein kann, Trotzdem auch andere Deutungen für die bei der Cholindehydrogenase in Mitochondrien-suspension beobachteten Effekte nach Thyroxinzusatz möglich sind, möchten wir vor allem die anschliessend gebrachte Hypothese in die Diskussion stellen.

Bei den Ergebnissen der Versuche mit Mitochondrien lässt sich eine gute Übereinstimmung mit den aus dem bisher vorhandenen Versuchsmaterial gewonnenen Beobachtungen über den Einfluss des Thyroxins auf die Atmungskettenphosphorylierung erkennen. Hohe Gaben an Thyroxin bewirken eine starke Abnahme der Aktivität der Cholindehydrogenase, welche von einer mittleren Konzentration des Thyroxins an mit dieser zunimmt. Nachdem in vitro die Wirkung des Thyroxins sich erst nach einer längeren Inkubationszeit zu erkennen gibt, liegt ausserdem die Vermutung nahe, dass das Thyroxin erst nach Einbau in einen Eiweissverband zu wirken vermag.

Zur Erklärung der umsatzfördernden Wirkung niederer Thyroxinkonzentrationen wird man wohl die Entkoppelung der Phosphorylierung heranziehen dürfen, die sich auch durch die Steigerung des O_2 -Verbrauchs der Mitochondrien ohne Cholinzusatz zu erkennen gibt. Von verschiedenen Seiten wird die vom Thyroxin verursachte erhöhte Grundatmung mittels Bestimmung des P:O-Faktors und anderer Methoden auf Entkoppelung von oxydativer Phosphorylierung und Atmung zurückzuführen versucht. Bei der Symbasie der von uns in vitro erhaltenen Werte des O_2 -Verbrauchs bei Grundatmung und Cholinveratmung in Bezug auf ihre Abhängigkeit von der Thyroxinkonzentration — atmungs- und umsatzfördernde Wirkung kleiner Konzentrationen und atmungs- und umsatzhemmende grösserer Konzentrationen an Thyroxin — kann auch bei der Cholinoxydation durch die Cholindehydrogenase ein analoges Verhalten des Thyroxins, Phosphorylierung und Atmung zu entkoppeln, angenommen werden.

Die Inhibition der Cholindehydrogenase durch grössere Dosen Thyroxin ist schwierig zu deuten, doch dürfte sich dabei eine toxische Wirkung des Thyroxins zu erkennen geben. Diese Umkehr der Wirkung bei höheren Konzentrationen ist aber gerade bei Thyroxin ein häufig festgestelltes Phänomen. Wo der Ansatzpunkt der Hemmung gesucht werden muss, ist freilich noch unklar.

Es besteht die Möglichkeit, dass bei den physiologischen Bedingungen des Organismus das Thyroxin bzw. das Schilddrüsenhormon durch seinen Einfluss auf den erzielbaren Umsatz durch die Cholindehydrogenase den von diesem Umsatz geregelten Cholinpiegel der Leber mitbestimmt. Da sich sowohl Thyroxin als auch Cholin u.a. bei Fettablagerung und Glykogenablagerung der Leber bemerkbar machen, könnte sich hier die Bedeutung des Zusammenspiels von Thyroxin und Cholindehydrogenase auf die in der Leber ablaufenden Stoffwechselprozesse zu erkennen geben.

VI. Einfluss von Vitamin K₁ auf die Veratmung des Cholins im Cholindehydrogenasesystem

Im Rahmen der Versuche zur Klärung der entkoppelnden Wirkung des Thyroxins auf Atmungskette und Phosphorylierung wird auch eine Mitbeteiligung verschiedener Vitamine mit Chinonstruktur zur Debatte gestellt. Dabei wird in erster Linie das Vitamin K₁, das Phyllochinon, in Betracht gezogen (Lit. 69, 82). Seine Funktion soll darin bestehen, dass es im Zusammenwirken mit der Chinonreduktase Wasserstoff von DPN-H₂ übernimmt und damit in das Wasserstofftransportsystem eingreift.

Bei dieser anscheinenden Verwicklung des Phyllochinons in die Atmungskette schienen Versuche über den Einfluss von Vitamin K₁ auf die Cholindehydrogenase von Interesse zu sein, für die der Phosphorylierungsprozess im Rahmen der Atmungskette festzustehen scheint. Für die Entkoppelung der Phosphorylierung durch Thyroxin sprechen die Ergebnisse unserer vorher gebrachten Untersuchungen.

— Der wieder angewandte Ausdruck „Aktivität der Cholindehydrogenase“ ist auch hier im Sinne des auf Seite 45 gebrachten Vorbehalts aufzufassen und bezieht sich auf den nach aussen in Erscheinung tretenden O₂-Verbrauch bei der Cholinveratmung. —

a) Untersuchungen über den Einfluss von Vitamin K₁ auf die Aktivität der Cholindehydrogenase

Zur Untersuchung dieser Frage wurde mit Ratten experimentiert, bei denen ein Vitamin K₁-Mangel erzeugt worden war. Des weiteren wurden Versuchsreihen unter Verwendung von Mitochondrien normaler und K₁-verarmter Tiere durchgeführt, wobei durch Zugabe von Vitamin K₁ in vitro dessen Einfluss auf die Aktivität der Cholindehydrogenase studiert wurde.

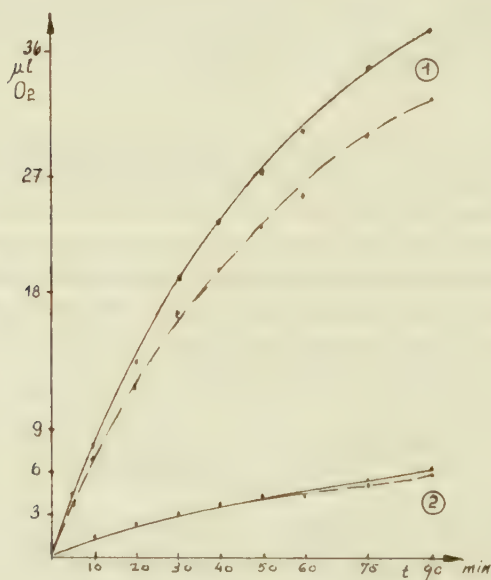
1.) Die Aktivität der Cholindehydrogenase der Leber bei Vitamin K₁-verarmten Ratten

Als Versuchstiere dienten Ratten, die weitgehend an Vitamin K₁ verarmt waren. Bei der weiten Verbreitung des Vitamins K₁ erwies es sich als notwendig, die Tiere auf eine eiweiss- und fettfreie Kost zu setzen und ihnen einzig vitaminfreie Stärke zu verfüttern. Der Stärke wurden alle Vitamine mit Ausnahme von K und E zur Vermeidung anderer Avitaminosen beigegeben. Da jedoch normalerweise durch die Darmbakterien genügend Vitamin K₁ erzeugt wird, musste zur Entfernung der Darmflora dem Futter ein Zusatz von Antibiotika gegeben werden.

Die zum Vergleich dienenden Tiere erhielten genau dieselbe Behandlung, nur wurde zu ihrer Nahrung zusätzlich Vitamin K und E gegeben. Nach vier bis sechs Wochen dauernder Diät wurde ein Vergleichspaar getötet und die Mitochondrien aus der Leber in üblicher Weise isoliert.

Der Sauerstoffverbrauch der beiden Mitochondriensuspensionen wurde mit und ohne Cholinzusatz (4 mg Cholinchlorid; herrschende Cholinchloridkonzentration in den Proben = $1.15 \cdot 10^{-2}$ Mol/l) in der Warburg-Apparatur gemessen, die Messwerte auf den Stickstoffgehalt der Mitochondriensuspension bezogen und untereinander verglichen. Im Gegensatz zu den bisherigen Untersuchungen wurden bei allen Vitamin K₁-Versuchen 0.8 ml Mitochondriensuspension je Warburg-Versuchsgefäß verwendet. In Abbildung 21 sind die Werte eines typischen Versuchs aufgetragen.

Abb. 21: Aktivität der Cholindehydrogenase der Mitochondrien von normalen und K₁-verarmten Tieren



—— Normaltier; - - - - K₁-Mangeltier.

Kurven 1: Sauerstoffverbrauch bei Zusatz von Cholinchlorid;

Kurven 2: Sauerstoffverbrauch ohne Cholinzusatz.

Tabelle 12 fasst die Ergebnisse dieser Versuche zusammen. Die Werte wurden aus jeweils zwei Parallelbestimmungen ermittelt. Bei der Ableitung der relativen Aktivität diente der O_2 -Verbrauch von Normaltieren als Basis; dieser wurde gleich 100 gesetzt. Aus den Einzelwerten für die relative Aktivität resultiert ein Mittelwert von 83. Man erkennt den deutlichen Abfall der Aktivität der Cholin-dehydrogenase bei den K_1 -Mangeltieren.

In der Grundatmung der Mitochondrien und beim Vergleich des Lebergewichts liessen sich keine bedeutenden Unterschiede zwischen Normaltier und K_1 -Mangel-tier feststellen.

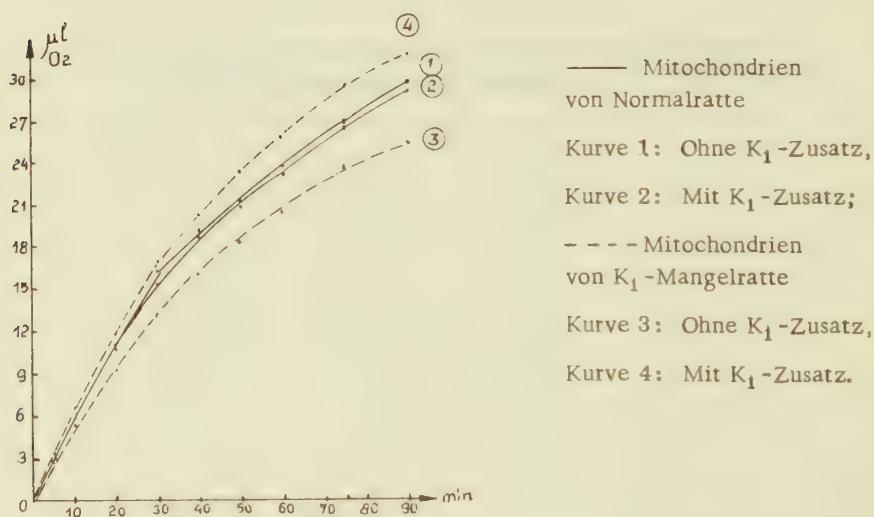
Tab. 12: Aktivität der Cholindehydrogenase von Lebermitochondrien
normaler und K_1 -verarmter Ratten

Versuchs- nummer	$\mu l O_2 / mg N$ Normaltier	$\mu l O_2 / mg N$ K_1 -Mangeltier	Rel. Aktivi- tät; Normal- tier = 100
1	30.6	27.8	91
2	31.4	26.9	86
3	30.0	26.6	88
4	33.2	25.9	78
5	31.1	26.8	86
6	29.2	21.4	73
7	30.9	24.1	78
8	28.9	22.5	78
9	26.7	25.8	97
10	29.8	26.9	90
11	32.4	24.4	76
12	31.4	26.8	85
13	31.4	22.5	72
14	27.0	27.0	100
15	30.3	22.3	74

2.) Die Aktivität der Cholindehydrogenase bei Zusatz von Vitamin K_1 in vitro

Es war bei den Untersuchungen in vitro erforderlich, die Mitochondrien längere Zeit mit dem Phyllochinon ⁺⁾ zu inkubieren, da direkter Zusatz von Vitamin K_1 zu den Versuchsansätzen vermutlich wegen der Schwerlöslichkeit des Öls keine Wirkung zeigte.

Abb. 22: Einfluss von Phyllochinon (inkubiert) auf die Aktivität der Cholindehydrogenase normaler und K_1 -verarmter Ratten bei Veratmung von Cholinchlorid



Die Verwendung von Lösungsvermittlern, wie z.B. Tween 80, erwies sich nicht angebracht, weil allein durch diese die Aktivität des Enzyms um 80-90% herabgesetzt wurde. Dagegen stellten sich nach der Inkubation der Mitochondrien mit dem Vitamin unter mehrmaligem Homogenisieren während dieser Zeit, wobei das Vergleichspräparat analog, aber ohne Vitaminzusatz, behandelt wurde

⁺⁾ Für die freundliche Überlassung der Versuchsmengen Phyllochinon sei der Deutschen Hoffmann-la Roche AG, Grenzach, auch an dieser Stelle bestens gedankt.

(siehe praktischer Teil), erhebliche Aktivitätsänderungen ein. Es wurden jeweils 3,5 ml Mitochondriensuspension mit der angegebenen Menge Vitamin K_1 behandelt.

In Abb. 22 ist der Sauerstoffverbrauch in μl (Ordinate) von Mitochondrien der Vergleichstiere Nr. 12, welche 18 Stunden lang mit 1 mg Vitamin K_1 (= Vitaminkonzentration in der Suspension von $6.7 \cdot 10^{-4}$ Mol/l) inkubiert worden waren, gegen die Zeit (Abszisse) aufgetragen. Der O_2 -Verbrauch dieser Mitochondrien, unmittelbar nach der Tötung dieser Versuchstiere bestimmt, wurde bereits in Abb. 21 gebracht.

In Tabelle 13 sind die Ergebnisse dieser Inkubationsversuche aufgeführt. Spalte 1 gibt die Nummer des Versuchstierpaares an; in Spalte 2 und 3 ist der Sauerstoffverbrauch in μl , bezogen auf den Stickstoffgehalt der Mitochondrien, welcher unmittelbar nach Tötung der Versuchstiere bestimmt wurde, eingetragen (vgl. Tabelle 12). Spalte 4 bezeichnet den Phyllochinonzusatz in mg je 3.5 ml Mitochondriensuspension, wobei die zugesetzten Mengen von 1, 2.6, 3 und 5 mg jeweils einer molaren Phyllochinonkonzentration von $6.7 \cdot 10^{-4}$ Mol/l, $1.47 \cdot 10^{-3}$ Mol/l, $2.01 \cdot 10^{-3}$ Mol/l und $3.35 \cdot 10^{-3}$ Mol/l entsprechen. Spalte 5 enthält die Inkubationszeit in Stunden. Die auf den Stickstoffgehalt der Mitochondrien umgerechneten O_2 -Werte von Normalratte (Spalte 6) und Mangerratte (Spalte 7), wobei beiden Suspensionen Vitamin K_1 zugegeben worden war, wurden in üblicher Weise bei Vorlage einer $1.15 \cdot 10^{-2}$ normalen Cholinchloridlösung erhalten. In den Spalten 8 (Normaltier) und 9 (Mangeltier) ist die relative Aktivität der mit Phyllochinon inkubierten Mitochondrien angegeben. Als Basis = 100 wurde dabei der in den Spalten 6 und 7 aufgeführte Sauerstoffverbrauch des gleich behandelten Anteils der Mitochondrien ohne Vitaminzusatz von Normaltier und K_1 -Mangeltier angenommen. Sämtliche Werte wurden aus zwei Parallelbestimmungen in der Warburg-Apparatur ermittelt.

Aus der Tabelle 13 ist zu entnehmen, dass die Inkubation der Mitochondrien mit Phyllochinon bei den normalen Tieren zu keiner bemerkenswerten Änderung in der Veratmung des Cholins durch die Cholindehydrogenase führte. Bei den Mitochondrien der K_1 -Mangeltiere zeigte sich jedoch ein erheblicher Anstieg der Cholinveratmung nach der Inkubation mit K_1 , wobei in einzelnen Fällen der Umsatz normaler Tiere sogar überschritten wurde.

Tab. 13: Einfluss von Phyllochinon (inkubiert) auf die Aktivität der Cholin-dehydrogenase der Lebermitochondrien normaler und K_1 -verarmter Ratten
bei Vorlage von 4 mg Cholinchlorid

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ver- such Nr.	$\mu\text{l O}_2/\text{mg N}$ unmittelbar nach Dekapitation		K_1 - Zu- satz mg	Inku- ba- tions- zeit Std.	O_2 -Verbrauch $\mu\text{l O}_2/\text{mg N}$		Relative Aktivität; O_2 -Verbrauch ohne K_1 -Zusatz = 100	
	Normal- Ratte	Mangel- Ratte			Normal- Ratte	Mangel- Ratte	Normal- Ratte	Mangel- Ratte
6	29.2	21.4	0	0	28.6	20.8	100	100
			1	0	29.1	21.0	102	101
			5	0	28.2	21.2	98	103
7	30.9	24.1	0	1	30.7	23.8	100	100
			1	1	31.2	24.6	102	104
			5	1	30.9	24.3	101	102
10	29.8	26.9	0	10	27.6	24.3	100	100
			1	10	28.1	28.1	102	116
			5	10	27.4	27.4	99	113
11	32.4	24.4	0	12	30.3	22.8	100	100
			1	12	30.4	27.4	100	120
			5	12	29.8	27.0	98	118
12	31.4	26.8	0	18	28.7	25.3	100	100
			1	18	29.3	31.6	99	125
			2.6	18	31.0	32.0	105	126
			5	18	27.8	34.1	94	135
15	30.3	22.3	0	24	28.2	20.4	100	100
			1	24	28.2	27.5	100	135
			3	24	27.7	25.8	98	127

b) Diskussion der Versuchsergebnisse

Das Hauptgewicht bei diesen Untersuchungen wurde auf die Veratmung des Substrats (Cholin) unter dem Einfluss von Phyllochinon gelegt. Deshalb unterblieb auch die Bestimmung des P:O-Faktors, welche bei Untersuchungen über die Atmungskettenphosphorylierung unerlässlich ist.

Es lassen sich beim Vergleich des Sauerstoffverbrauchs von Normaltier und Mangeltier charakteristische Abweichungen erkennen. Diese Effekte können eindeutig einer K_1 -Verarmung zugeschrieben werden, da sich die Haltung der Tiere nur durch Zusatz der beiden Vitamine mit Chinonstruktur, K und E, bei den als Normaltieren bezeichneten Ratten zur eiweiss- und fettfreien Diät unterschieden.

Der bei den K_1 -Mangeltieren festgestellte Abfall der Cholinveratmung, welcher im Extremfall 28%, durchschnittlich jedoch 17% betrug, konnte durch längere Inkubation mit Vitamin K_1 weitgehend oder gänzlich aufgehoben werden. Es wurden nach 18- bis 24ständiger Inkubation Umsatzsteigerungen bis zu 35% erzielt. Wie schon erwähnt wurde, spielt die Dauer der Inkubationszeit dabei eine Rolle. Erst nach zehnstündiger Inkubation konnten von der Fehlergrenze sich deutlich abhebende Resultate erreicht werden. Als optimale Dosis an Vitamin K_1 erwies sich bei unseren Bedingungen eine Inkubation in $6.7 \cdot 10^{-4}$ bis $1.74 \cdot 10^{-3}$ molarer Lösung.

Dass bei Verwendung höherer K_1 -Menge die Aktivität der Cholindehydrogenase nicht mit steigender Konzentration K_1 zunimmt, kann dadurch erklärt werden, dass nur ein Sättigungszustand der Mitochondrien an K_1 erreicht werden kann. Es wurden im Vergleich zu MARTIUS (Lit. 69), welcher mit Hühnerleber und Hühnermark experimentierte, wesentlich höhere Dosen an Phyllochinon verwendet, wobei zu bemerken ist, dass der Gehalt an Cholindehydrogenase bei Rattenleber bedeutend grösser ist als in der Hühnerleber und im Hühnermark. MARTIUS untersuchte ausserdem die Veratmung von β -Oxybutyrat und Succinat bei geringeren Phyllochinonzusätzen, so dass die von ihm erzielten Ergebnisse mit den von uns bei der Cholinveratmung unter höheren K_1 -Zusätzen gewonnen wohl nicht ohne weiteres vergleichbar sind. Bezüglich der Grundatmung lässt sich bei beiden Versuchsreihen übereinstimmend keine wesentliche Änderung im Sauerstoffverbrauch durch den Phyllochinonzusatz erkennen. Dagegen führte die verschiedene Substratveratmung zu grundsätzlichen Unterschieden. Der Phyllochinonzusatz bewirkte bei der Cholinveratmung durch Rattenlebermitochondrien eine Steigerung (siehe oben), während sich bei der Veratmung von β -Oxybutyrat und Succinat durch Mitochondrien aus Hühnerleber und Hühnermark gleichbleibende oder abfallende Werte ergaben.

Vitamin-K₁-Zusatz zu den Mitochondrien von Normaltieren blieb, wie schon erwähnt, auf die Grösse des Sauerstoffverbrauchs ohne wesentliche Wirkung. Darin liegt ein weiterer Beweis dafür, dass der geringere O₂-Verbrauch bei den Mitochondrien von K₁-Mangeltieren nur durch die K₁-Verarmung verursacht wird. Zugleich spricht dieses Ergebnis auch für einen optimalen Sättigungszustand der Mitochondrien an Vitamin K₁, dessen Grenze nicht überschritten werden kann.

Diese Resultate können als Beweis für einen Einfluss des Vitamin K₁ auf die Oxydation des Cholins durch die Cholindehydrogenase gewertet werden. Wieweit dieser Einfluss dabei mit Phosphorylierungsvorgängen verknüpft ist, kann von unseren Versuchsbedingungen aus nicht entschieden werden.

Die hier beschriebenen Ergebnisse können nur Anhaltspunkte für eine gründliche Bearbeitung dieses Problems sein, welche sich vor allem auf den Vergleich von Cholin, Succinat, β -Oxybutyrat und ihren Kombinationen in unserem System, unter Berücksichtigung der verschiedenen Potentiale, des P:O-Faktors, der Bestimmung der vorhandenen Vitamin-K₁-Konzentration (Gerinnungsfaktor) und anderer Faktoren, erstrecken müsste.

Es sei aber in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen, dass unsere Aufmerksamkeit der Veratmung von Cholin als Substrat unter dem Einfluss verschiedener Katalysatoren galt und nicht so sehr der Atmungskette und Atmungskettenphosphorylierung.

C) Praktischer Teil

Im folgenden soll auf die experimentelle Anlage bei der Durchführung unserer Untersuchungen näher eingegangen werden. Neben der Beschreibung der Gewinnung der Mitochondrienpräparate und der löslichen Cholindehydrogenase, den diversen Versuchsanordnungen und Messmethoden, die von der jeweiligen Problemstellung bedingt waren, wird auch über einige neue quartäre Ammoniumsalze berichtet, welche als Testsubstanzen dienten. Darstellung und Eigenschaften dieser Verbindungen werden gebracht und von einigen die Daten ihrer Toxizität angeführt.

I. Darstellung der Mitochondrienpräparate

Zu den Untersuchungen über die Cholindehydrogenase wurden junge, männliche Ratten eines Inzuchtstammes verwendet, welche je nach der Versuchabsicht eine entsprechende Vorbehandlung erhielten, nach dieser durch Dekapitation getötet und sofort seziiert wurden. Alle weiteren Schritte erfolgten bei einer Temperatur von 0-3°C.

Die so erhaltene, bei 0°C gewogene und grob zerkleinerte Rattenleber wurde zunächst durch Musselin gepresst und mit eiskaltem KREBS-RINGER-Phosphatpuffer (p_H 7.4; Darstellung nach Literatur 83), isotonisch für Rattenserum, im Verhältnis 1:3 verdünnt. Nach der Homogenisierung im Homogenisator nach POTTER-ELVEHJEM wurde das Homogenat zunächst 5 Minuten lang bei 800·g bis höchstens 1000·g zur Entfernung grober Zellteile zentrifugiert, anschliessend das Überstehende 15 Minuten lang bei 5000-6000·g.

Nach sorgfältiger Entfernung des obenliegenden weissen Häutchens, das bei den Versuchen eine starke Hemmwirkung auf die Aktivität der Cholindehydrogenase zeigte, wurde das Überstehende verworfen. Der Bodenkörper, in der Hauptsache aus der Mitochondrienfraktion bestehend, wurde wieder mit der dreifachen Menge des ursprünglichen Rohgewichts der Leber an KREBS-RINGER-Lösung aufgenommen, homogenisiert, wieder bei 5000-6000·g zentrifugiert, das Überstehende wieder verworfen, neu aufgenommen usw., bis nach dreimaliger Wiederholung dieses Verfahrens eine gänzlich klare Flüssigkeit überstand. Die durch diese Behandlung von verschiedenen Hemmstoffen, Salzen und Verunreinigungen befreiten Mitochondrien wurden wieder auf die Verdünnung 1:3 gebracht, homogenisiert und im Eiskühlschrank aufbewahrt. Die nach dieser Methode gewonnenen Mitochondrien waren bei 0°C bis zu einer Woche haltbar (Abfall der Aktivität der Cholindehydrogenase nach einer Woche etwa 50%). Die Aktivität der gereinigten (frischen) Mitochondriensuspension lässt sich durch Mikrokjeldahlbestimmungen verfolgen, da zwischen Stickstoffgehalt und Cholindehydrogenaseaktivität eine Symbasie besteht (Lit. 84).

II. Darstellung der löslichen Cholindehydrogenase

a) Mitochondrien-Trockenpulver

Die Lebern von 4 Ratten wurden wie oben erhalten und bei 0°C in Pufferlösung (dreifache Menge ihres Rohgewichts) homogenisiert. Die Suspension wurde dann in der Kältezentrifuge (PhyWE) bei 0-(-)3°C zunächst bei 600·g und dann das Überstehende bei 10 000·g jeweils 20 Minuten gefahren. Der beim zweiten Arbeitsgang erhaltene Niederschlag der Mitochondrienfraktion wurde noch zweimal mit Puffer aufgenommen und wieder abzentrifugiert. Der so gewonnene gereinigte Niederschlag wurde sodann zweimal mit seinem doppelten Volumen Aceton aufgenommen, homogenisiert und bei 10 000·g 10 Minuten lang zentrifugiert. Abschliessend wurde die Mitochondrienfraktion zweimal in ihrem doppelten Volumen Äther suspendiert und wieder abzentrifugiert (10 000 g, · 10 Min.). Das so bereitete Trockenpulver wurde für 1 Minute auf Filtrierpapier gebreitet und dann im Vakuumexsiccator ätherfrei gesaugt. Es war im Eisschrank etwa 4 Tage haltbar.

b) Eluierung der Cholindehydrogenase aus dem Aceton-Trockenpulver

400 mg des Trockenpulvers wurden bei 0°C mit 2 ml einer 4.3 proz. Natrium-cholatlösung (p_H 6.8) homogenisiert (1 Minute), sodann mit Phosphatpuffer (p_H 6.8) auf 10 ml gebracht, homogenisiert und 10 Minuten stehengelassen. Danach wurde die Suspension in der Kältezentrifuge (-3 bis 0°C) 15 Minuten lang bei 10 000·g gefahren. Der überstehende Anteil wurde sorgfältig abgehoben; er enthielt die Cholindehydrogenase. Bei Aufbewahrung im Eisschrank verlor dieses Präparat etwa 70% seiner Aktivität binnen 24 Stunden.

III. Erzeugung von Vitamin K₁-Mangel bei Ratten

Als Versuchstiere wurden junge entwöhnte Ratten verwendet. Wegen des häufigen Vorkommens von Vitamin K in den natürlichen Nahrungsmitteln wurden diese Tiere bei fett- und eiweissfreier Diät gehalten und mit vitaminfreier Stärke (Merck), welcher sämtliche Vitamine ausser K und E in Form der üblichen Handelspräparate verschiedener Herkunft zugesetzt waren, ernährt. Die Vitaminpulver wurden gleichmässig mit der Stärke vermischt, und täglich annähernd in folgender Dosierung je kg Tiergewicht verabreicht: Vitamin A: 80 I.E.; Vitamin B₁: 0.05 mg; Vitamin B₂: 0.05 mg; Vitamin B₆: 0.003 mg; Vitamin B₁₂: 0.01 γ ; Vitamin C: 2 mg; Vitamin D: 8 I.E.; Nicotinsäureamid: 0.33 mg; Folsäure: 0.01 mg; Ca-Pantothenat: 0.01 mg. An je eine Ratte wurden täglich ca 25 g Stärke, welche ausser dem Vitaminzusatz noch ein übliches Mineralsalzgemisch enthielt, verfüttert.

Da durch die Darmbakterien die Ratten mit der nötigen Vitamin K-Menge versorgt wurden, wurden zur Entfernung der Darmflora jedem Tier alle zwei Tage verschiedene Antibiotika, z.B. Chloromycetin (in Form von Leukomycin Bayer, 50 mg/kg Tiergewicht), Aureomycin und andere, mit der Nahrung verabreicht.

Die Kontrolltiere wurden in vollkommen analoger Weise gehalten, nur erhielt ihre Nahrung noch zusätzlich Vitamin K (täglich 1.5 mg/kg Tiergewicht) und Vitamin E (täglich 1 mg/kg Tiergewicht).

Nach vier- bis sechswöchiger Haltung der Ratten unter diesen Bedingungen war bei den Tieren der für unsere Untersuchungen benötigte Vitamin K-Mangel erreicht.

IV. Messmethodik

a) Warburg-Apparatur

Die Untersuchungen in der Warburg-Apparatur erfolgten in üblicher Weise. Zur Umrechnung des gemessenen O₂-Verbrauchs in µl auf Normalbedingungen wurde die Gleichung benützt:

$$x = h \cdot \frac{V_g \cdot 275/T - V_{fl} \cdot \alpha}{p_0}$$

Hierin bedeuten: x, das gesuchte Sauerstoffvolumen in µl bei 0°C und 760 mm Hg; h, die Änderung des Manometerstandes in mm; V_g, das Gasvolumen (= Gesamtvolumen - Flüssigkeitsvolumen); V_{fl}, das Volumen der Flüssigkeit im Gefäß; α, die Löslichkeit des Sauerstoffs in der Flüssigkeit; T, die absolute Temperatur; p₀, Normaldruck.

Die Badtemperatur betrug 38°C; die Ablesungen erfolgten nach 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75 und 90 Minuten. Die nach obiger Gleichung errechneten Werte ergaben nach der Korrektur mit dem Wasserwert den wirklichen Sauerstoffverbrauch in ul. (Der Wasserwert, welcher aus dem Manometerstand eines mitgeschüttelten Leergefäßes bestimmt wird, erfasst kleinste Temperaturschwankungen des Wasserbades, welche zu immerhin beachtlichen Verschiebungen des Manometerstandes führen können.)

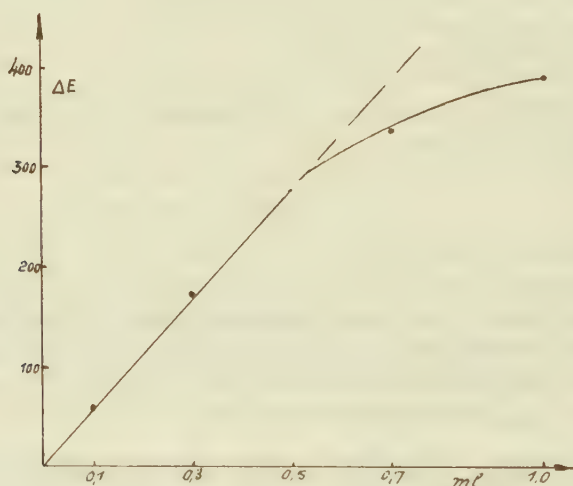
b) Kolorimetrische Messmethode

Die kolorimetrischen Messungen mit löslicher Cholindehydrogenase wurden im Photometer „Eppendorf“ durchgeführt. Die Extinktion des Wasserstoffacceptors, Dichlorphenolindophenol (DPHl) liegt bei etwa 600 mµ und konnte mit dem Filter Hg 578 und der Photozelle 90 S beobachtet werden. Die verwendeten

Küvetten hatten 3 ml Inhalt bei einer Schichtdicke von 10 mm. Als optimale Farbkonzentration erwies sich ein Zusatz von 1 ml einer 10 mg proz. Lösung von DPhI. Auf diesen Standard-Wert wurden die beobachteten Werte bezogen und so ΔE erhalten.

Zur Ermittlung der besten Enzymkonzentration wurde eine Versuchsreihe mit gleicher Menge Cholin und variierten Mengen Cholsäure-Enzymextrakt getestet. Die Ergebnisse werden in Abb. 23 gezeigt. Da bis 0.5 ml Enzympräparat ein linearer Anstieg vorliegt, wurde bei allen weiteren Versuchen mit dieser Menge gearbeitet.

Abb. 23: Einfluss der Enzymkonzentration auf die Oxydation von Cholin



Abszisse: ml Enzympräparat;

Ordinate: ΔE bei Vorlage von 0.5 mg Cholinchlorid und 0.1 mg Farbstoff;
10 Minuten Versuchsdauer.

Der bei 0.5 ml Enzympräparat und 0.5 mg Cholin erzielte Umsatz-Mittelwert wurde auch als Bezugswert für Versuche mit bereits teilweise inaktivierten Präparaten herangezogen.

Die Versuche selbst wurden so durchgeführt, dass nach der Füllung der beiden Küvetten mit den gewünschten Substanzen (siehe unten) im Zeitpunkt 0 das Enzympräparat zugegeben, rasch umgeschüttelt und die Reaktion über den Zeit-

abschnitt von 10-12 Minuten verfolgt wurde, wobei jede halbe Minute abgelesen wurde. Die Versuchstemperatur betrug im Durchschnitt 18°C.

V. Beschickung der Reaktionsgefäße

a) Warburg-Gefäße

1.) Grundansatz:

Unter dem Begriff „Grundansatz“ ist in den folgenden Versuchsansätzen eine stets gleichbleibende Beschickung der Reaktionsgefäße zu verstehen. Die weiteren Zusätze, die jeweils angeführt werden, richteten sich nach der Versuchsabsicht.

Beim Grundansatz wurden die Reaktionsgefäße in folgender Weise beschickt: In den Zentralraum wurden 0.2 ml Kalilauge (10proz.) einpipettiert. Der Hauptraum enthielt 0.5 ml Mitochondriensuspension (Verdünnung 1:3, siehe S. 55), 0.6 ml KREBS-RINGER-Phosphatpuffer (p_H 7.4) (Lit. 83), 0.2 ml Cytochrom c ($2 \cdot 10^{-4}$ Mol/l) und 0.1 ml Diphosphopyridinnucleotid (DPN) ($1 \cdot 10^{-2}$ Mol/l). Cytochrom c und DPN wurden in Form der normalen Handelspräparate der Fa. Boehringer, Mannheim, verwendet.

Bei jeder Versuchsreihe wurde ein Reaktionskölbchen, welches den Grundansatz allein, ohne veratembares Substrat, enthielt, mitgeschüttelt und der Sauerstoffverbrauch in gleicher Weise abgelesen. Dadurch wurde die Sauerstoffquote der Gewebeveratmung ermittelt.

2.) Reaktionsansatz bei der Prüfung der Spezifität der Cholindehydrogenase

Das dem Grundansatz (Hauptraum) als veratembares Substrat zugesetzte Cholinchlorid (Merck) wurde in 4proz. Lösung in das seitliche Kippgefäß einpipettiert. Die zur Untersuchung herangezogenen cholinähnlichen Verbindungen wurden als Chloride in einer der Cholinchloridlösung entsprechenden molaren Konzentration verwendet. Es wurden stets nebeneinander Gefäße mit angeführter Beschickung angesetzt: Gefäß 1: Grundansatz; Gefäß 2: Grundansatz + Cholin; Gefäß 3 und 4 . . . : Grundansatz + cholinähnliche Substanz. Bei Gefäß 1 wurde zur Einhaltung gleicher tonischer Verhältnisse eine der Cholinchloridkonzentration entsprechende Menge an Kochsalzlösung zugesetzt.

Das Gesamtvolumen wurde durch Zugabe von Wasser in den Hauptraum auf 2.5 ml gebracht. Die Atmung erfolgte mit Luft. Der Sauerstoffverbrauch bei der Veratmung von Cholinchlorid diente als Vergleichsbasis für die Konsumwerte bei der Oxydation der cholinähnlichen Verbindungen.

3.) Ansatz bei den Inhibitionsversuchen

Bei der Prüfung der Inhibitionswirkung von quartären Ammoniumsalzen auf die Aktivität der Cholindehydrogenase wurden die auf Seite 18-20 angeführten Verbindungen in der jeweiligen Konzentration dem Grundansatz im Hauptraum zugefügt. 0.1 ml Cholinchloridlösung (4proz.) wurde in das seitliche Kippgefäß gebracht. Es wurde der Sauerstoffverbrauch von folgenden Proben miteinander verglichen: Gefäß 1: Grundansatz; Gefäß 2: Grundansatz + Cholin; Gefäß 3, 4. . . : Grundansatz + Cholin + Inhibitor. Zur Herstellung isotonischer Verhältnisse wurden den Gefäßen 1 und 2 und den Proben mit geringeren Hemmstoffkonzentrationen stets eine der Differenz zur höchsten Salzkonzentration entsprechende Menge Kochsalzlösung zugesetzt. Das Gesamtvolumen betrug wie zuvor 2.5 ml.

Vor dem Einkippen des Cholinchlorids in den Hauptraum wurden die Reaktionsgefäße 15 Minuten lang bei der Temperatur von 38°C inkubiert. Die Atmung erfolgte mit Luft.

4.) Ansatz bei der Untersuchung des Einflusses von Glutathion auf die Aktivität der Cholindehydrogenase

In das seitliche Kippgefäß wurden bei den entsprechenden Versuchen 0.1 ml 4proz. Cholinchloridlösung gegeben. Das Glutathion (GSH, Glutathion-red., Boehringer, Mannheim) wurde in stets frisch hergestellter Lösung unmittelbar vor Versuchsbeginn in einer Konzentration von 1% oder 4% im Hauptraum dem Grundansatz zugesetzt. Die Beschickung der gleichzeitig geschüttelten Versuchsgefäße war stets folgende: Gefäß 1: Grundansatz; Gefäß 2: Grundansatz + GSH; Gefäß 3: Grundansatz + Cholin; Gefäß 4: Grundansatz + Cholin + GSH. Zur Herstellung isotonischer Verhältnisse wurden in den Gefäßen 1 und 3 eine der Menge des Glutathions, in den Gefäßen 1 und 2 eine der Konzentration des Cholins äquivalente Menge Kochsalzlösung im Hauptraum beigegeben. Durch Wasserzusatz wurde in allen Kölbchen ein Gesamtvolumen von 2.5 ml hergestellt. Der Oxydationsvorgang ging wieder mit Luft vor sich.

5.) Ansatz bei der Untersuchung des Einflusses von Thyroxin auf die Aktivität der Cholindehydrogenase

Es wurde der Sauerstoffverbrauch von 0.1 ml 4proz. Cholinchloridlösung, welche zu Versuchsbeginn aus dem seitlichen Kippgefäß in den Hauptraum eingekippt wurde, beobachtet.

Bei den Versuchen in vivo wurde gleichzeitig der Sauerstoffverbrauch bei folgender Gefäßbeschilderung untersucht: Gefäß 1: Grundansatz mit Mitochondrien von Normaltieren; Gefäß 2: Grundansatz mit Mitochondrien von Thyroxin-gespritzten Tieren; Gefäß 3: Grundansatz mit Normaltiermitochondrien + Cholin; Gefäß 4: Grundansatz mit Thyroxintier-Mitochondrien + Cholin. Den Gefäßen 1 und 2 wurde eine dem tonischen Effekt der Cholinchloridlösung entsprechende Kochsalzmenge zugesetzt.

Bei den Versuchen in vitro mit Mitochondrien, die mit Thyroxin inkubiert worden waren, wurden die Gefäße 1: Grundansatz mit normalen Mitochondrien; 2: Grundansatz mit inkubierten Mitochondrien; 3: Grundansatz mit normalen Mitochondrien + Cholin; 4: Grundansatz mit inkubierten Mitochondrien + Cholin, parallel angesetzt. Auch hier waren die Gefäße 1 und 2 mit einer der Konzentration des Cholins äquivalenten Kochsalzmenge tonisch ausgeglichen. Die Beatmung mit Luft wurde bei einem Gesamtvolumen von 2.5 ml durchgeführt.

6.) Ansatz bei der Untersuchung des Einflusses von Vitamin K₁ auf die Cholindehydrogenase

Hier unterschied sich der Grundansatz insofern, als nicht 0.5 ml Mitochondriensuspension sondern 0.8 ml zur Verwendung kamen. Die übrigen Zusätze blieben jedoch unverändert.

0.1 ml 4proz. Cholinchloridlösung wurde wie zuvor bei Versuchsbeginn aus dem seitlichen Kippgefäß zum Grundansatz gekippt. Beim Vergleich des Sauerstoffverbrauchs der Mitochondrien von Normaltieren und Vitamin K₁-Mangeltieren — beide allerdings mit eiweiß- und fettfreier Diät ernährt — wurden Gefäße mit folgender Beschilderung gleichzeitig angesetzt: Gefäß 1: Grundansatz mit Mitochondrien von Normaltieren; Gefäß 2: Grundansatz mit Mitochondrien von K-Mangeltieren; Gefäß 3: Grundansatz mit Mitochondrien von Normaltieren + Cholin; Gefäß 4: Grundansatz mit Mitochondrien von K-Mangeltieren + Cholin.

Die Untersuchungen in vitro, bei Verwendung von mit Vitamin K₁ inkubierten Mitochondrien, wurden in angegebener Anordnung durchgeführt: Gefäß 1: Grundansatz mit nichtinkubierten Mitochondrien; Gefäß 2: Grundansatz mit inkubierten Mitochondrien; Gefäß 3: Grundansatz mit nicht inkubierten Mitochondrien + Cholin; Gefäß 4: Grundansatz mit inkubierten Mitochondrien + Cholin.

Bei beiden Versuchsreihen wurden den Gefäßen 1 und 2 zur Herstellung der Isotonie ein dem Cholinchlorid entsprechendes Äquivalent Kochsalz zugefügt. Es wurde durch Wasserzugabe ein Gesamtf Flüssigkeitsvolumen von 2.5 ml hergestellt und mit Luft beatmet.

Die Inkubation der Mitochondriensuspension erfolgte in der Weise, dass jeweils 4.0 ml Suspension bei 0°C mit 5 mg, 13 mg, 15 mg oder 25 mg Vitamin K₁ im Homogenisator nach POTTER-ELVEHJEM homogenisiert und dann bei 0°C gehalten wurden, wobei alle 3-4 Stunden wieder homogenisiert wurde. Die Vergleichsmitochondrien erhielten dieselbe Behandlung, nur ohne Vitamin K₁-Zusatz.

b) Beschickung der Küvetten bei den kolorimetrischen Untersuchungen

1.) Grundansatz

Die Küvette wurde mit 0.5 ml Enzympräparat, 1.0 ml Phosphatpuffer (p_H 6.8) 1.0 ml DPhI (10 mgproz.) gefüllt.

Bei jedem Versuch wurde dieser Ansatz, dem noch eine der Cholinmenge entsprechende Kochsalzmenge zugesetzt war, mit Wasser auf 3.0 ml gebracht und als Blindwert mitbeobachtet.

Bei den Untersuchungen mit Cholin ohne Hemmstoff wurde zu diesem Grundansatz das Cholinchlorid in der gewünschten Konzentration zugegeben.

2.) Ansatz bei den Versuchen mit Inhibitoren

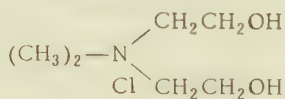
Die Ansätze blieben die gleichen wie oben, nur wurde das Enzympräparat vor dem Einpipettieren mit dem Inhibitor inkubiert und zwar bei Neurin 10 Minuten und bei Thyroxin 1 Stunde.

Durch den Zusatz von Hemmstofflösung wurde das Enzympräparat verdünnt. Es wurde daher eine dem Zusatz entsprechende grössere Menge einpipettiert.

Der Vergleich mit dem normalen Cholinumsatz erfolgte durch einen Parallelversuch unmittelbar vor oder nach dem Hemmversuch.

VI. Darstellung und Eigenschaften der quartären Ammoniumverbindungen

1.) Darstellung des Dimethyl-dihydroxyäthyl-ammoniumchlorids



Als Ausgangsmaterialien wurden Dimethyl-β-hydroxyäthylamin und β-Chlor-äthanol (Äthylenchlorhydrin) verwendet.

45 Gramm (50 ml) Dimethyläthanolamin und 42 Gramm (35 ml) β -Chloräthanol werden mit 70 ml abs. Äthanol in einem Rundkolben zusammengegeben. Man erwärmt langsam am Rückflusskühler bis die Reaktion einsetzt. Dann entfernt man den Brenner und lässt die Reaktion weiterlaufen, wobei gelegentliches Fächeln mit der Flamme nötig sein kann. Nach Abklingen der Reaktion lässt man 40 Minuten am Rückfluss kochen. Bei längerem Kochen färbt sich die Lösung zunehmend dunkelbraun, die Ausbeute sinkt und das Reaktionsprodukt ist stark verunreinigt. Nach 40 Minuten lässt man abkühlen und stellt die Flüssigkeit über Nacht in den Eisschrank. Es bildet sich ein dichter Niederschlag von groben Kristallen, die abgenutscht und mit sehr wenig eiskaltem Alkohol einmal gewaschen werden.

Aus der Mutterlauge kann durch Ausfällen noch eine geringe Menge des Reaktionsprodukts gewonnen werden, welches aber sehr stark verunreinigt ist und bei Zugabe zur Hauptmenge die Reinigung derselben erschwert und die Endausbeute erniedrigt. Die Kristalle werden zunächst in wenig absolutem Alkohol, eventuell unter Zusatz von Kohle, aufgelöst, mit Äther gefällt und abgenutscht. Nach nochmaligem Auflösen in Alkohol lässt man auskristallisieren.

Nach öfterer Umkristallisation erhält man rein weisse, grobe Kristalle, die verhältnismässig wenig hygroskopisch sind. Ausbeute etwa 72%. Festpunkt des Chlorids 278°C.

Analysen: $C_6H_{16}O_2NCl$ (169.65)

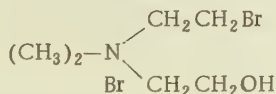
5.45 mg Subst.: Gef.: 8.45 mg CO_2 entspricht 42.3% C; ber.: 42.5%.

5.45 mg Subst.: Gef.: 4.69 mg H_2O entspricht 9.65% H; ber.: 9.5%.

387.5 mg Subst.: Gef.: 22.7 ml 0.1n HCl entspricht 8.2% N; ber.: 8.2%.

68.7 mg Subst.: Gef.: 57.48 mg AgCl entspricht 20.7% Cl; ber.: 20.9%.

2.) Darstellung des Dimethyl- β -Bromäthyl- β -hydroxyäthylammoniumbromids



Die Darstellung dieser Verbindung ging vom Dimethylaminoäthanol und 1,2-Dibromäthan (Äthylenbromid) aus.

45 g (50 ml) Dimethylaminoäthanol und 100 g (46 ml) Äthylenbromid werden in 50 ml abs. Alkohol auf dem Wasserbad 2 Stunden lang erhitzt. Nach dem Erkalten stellt man das Reaktionsprodukt 2 Tage lang in den Eisschrank, wobei sich

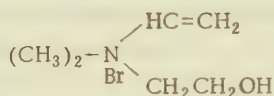
ein Niederschlag von weissen Kristallen bildet. Aus der Mutterlauge kann durch vorsichtige Fällung mit wenig Äther noch eine zusätzliche Ausbeute an weisser Substanz erzielt werden. Man kristallisiert einige Male aus abs. Alkohol um und erhält ein Pulver rein weisser Kristalle. Die Ausbeute liegt bei 80 %.

F.P. des Bromids 149° C, Zersetzung unter Aufschäumen bei 157°.

Analysen: $C_6H_{15}ONBr_2$ (277.02)

10.07 mg Subst.: Gef.: 9.52 mg CO_2 entspr. 26.2% C; ber.: 26.4 %.
 10.07 mg Subst.: Gef.: 4.93 mg H_2O entspr. 15.2% H; ber.: 15.12 %.
 158.35 mg Subst.: Gef.: 5.96 ml 0.1n HCl entspr. 5.1% N; ber.: 5.05 %.
 52.10 mg Subst.: Gef.: 35.5 mg AgBr entspr. 28.8% Br; ber.: 28.8 %.

3.) Darstellung des Dimethyl-vinyl-hydroxyäthylammoniumbromids



Die Darstellung erfolgte durch Abspaltung von HBr aus dem Dimethyl-hydroxy-äthyl-bromäthylammoniumchlorid.

Zu 5.6 g dieser zuvor beschriebenen Verbindung wird eine eiskalte Lösung von Kaliumalkoholat, welche durch Auflösen von 1 g Kalium in 50 ml Alkohol gewonnen wurde, gegeben. Man lässt eine Stunde im Dunkeln stehen und filtriert danach das ausgeschiedene Kaliumbromid ab. Aus dem Filtrat fällt man zunächst mit der dreifachen Menge Äther aus, wobei ein weisses Pulver abgeschieden wird. Durch öfteres Umkristallisieren aus Alkohol-Äther erzielt man eine analysenreine Substanz, die sehr hygroskopisch ist. Ausbeute etwa 50%.

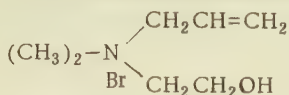
Aus der konzentrierten alkoholischen Lösung kann man durch Zugabe von Perchlorsäure analysenreines Perchlorat gewinnen.

F.P. als Bromid 342/43° C; F.P. als Perchlorat 296° C.

Analysen: $C_6H_{14}ONBr$ (196.09)

15.75 mg Subst.: Gef.: 21.14 mg CO_2 entspricht 36.65% C; ber. 36.75 %.
 15.75 mg Subst.: Gef.: 10.23 mg H_2O entspricht 7.25% H; ber.: 7.17 %.
 53.98 mg Subst.: Gef.: 2.69 ml 0.1n HCl entspricht 7.0% N; ber.: 7.14 %.
 50.9 mg Subst.: Gef.: 48.6 mg AgBr entspricht 40.64% Br; ber.: 40.75 %.

4.) Darstellung des Dimethyl-propen(2)yl- β -hydroxyäthyl-ammoniumbromids



Diese Verbindung wurde aus Allylbromid und Dimethylaminoäthanol synthetisiert.

45 g Dimethylaminoäthanol und 70 g Allylbromid werden mit 70 ml abs. Alkohol am Rückfluss 90 Minuten lang erhitzt. Nach dem Erkalten fällt man mit der dreifachen Menge Äther, nimmt die untere ölige Schicht in Alkohol auf, fällt wieder usw. Nach mehrmaliger Wiederholung dieses Verfahrens schüttelt man die ölige Schicht 2-3mal mit Benzol und abschliessend mit Äther durch und stellt sie im Vakuumexsiccator in den Eisschrank. Nach etwa einer Woche beginnt die Kristallisation der Substanz. Man erhält eine Kristallmasse, die an der Luft sofort zerfliesst. Ausbeute etwa 65%.

Auch durch Perchlorsäure lässt sich kein einwandfrei kristallisiertes Produkt erzielen.

F.P. der ungemein hygroskopischen Verbindung als Bromit zwischen 65 und 75°C; Festpunkt als Pikrat 193°C.

Analysen: $\text{C}_7\text{H}_{16}\text{ONBr}$ (210.12)

98.5 mg Subst.: Gef.: 4.5 ml 0.1n HCl entspr.: 6.5% N; ber.: 6.66%.

77.2 mg Subst.: Gef.: 68.2 mg AgBr entspr.: 37.7% Br; ber.: 38.03%.

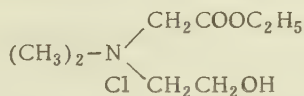
$\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_9$ (375.31)

18.26 mg Subst.: Gef.: 26.83 mg CO_2 entspr.: 40.32% C; ber.: 41.60%.

18.26 mg Subst.: Gef.: 8.32 mg H_2O entspr.: 2.51% H_2 ; ber.: 2.55%.

5.) Darstellung des N-Dimethyl-N- β -hydroxyäthyl-glyzinäthylesterhydrochlorids

Zur Synthese dieser Verbindung wurden Monochloressigsäureäthylester und Dimethylaminoäthanol als Ausgangsmaterialien verwendet.



50 g Dimethylaminoäthanol und 75 g Chloressigester werden mit 100 ml abs. Alkohol zusammengegeben und langsam am Rückflusskühler bis zum Einsetzen der Reaktion erwärmt. Die Reaktion verläuft sehr stürmisch und muss durch Kühlen gesteuert werden. Zur Vervollständigung des Umsatzes erhitzt man abschliessend noch 40 Minuten am Wasserbad. Es gelang trotz allen Bemühungen nicht, die Substanz zur Kristallisation zu bringen. Die Isolierung erfolgte daher durch Ausfällen mit Äther. Die weitere Reinigung geschah durch mehrere Umfällungen

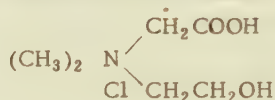
mit Alkohol-Äther. Abschliessend wurde die gallertige Masse mehrmals mit Benzol und Äther gewaschen. Die Substanz ist sehr hygroskopisch. Ausbeute etwa 78%.

Analysen: $C_8H_{18}O_3NCl$ (211.69)

135.2 mg Subst.: Gef.: 6.25 ml 0.1n HCl entspr. 6.5% N; ber.: 6.61%.

148.6 mg Subst.: Gef.: 99.2 mg AgCl entspr. 16.5% Cl; ber.: 16.74%.

6.) Darstellung des N-Dimethyl-N- β -hydroxyäthylglyzin-hydrochlorids



Diese Substanz wurde aus der obigen Verbindung durch Verseifen gewonnen.

Zu diesem Zweck werden 20 g des hergestellten Glyzinesters mit etwa 8proz. Salzsäure zunächst 1 Stunde am Rückflusskühler erhitzt und anschliessend zweimal auf dem Wasserbad zur Trockne eingedampft. Zur Entfernung anhaftender Salzsäure wird noch dreimal mit Wasser abgedampft, zuletzt im Vakuum. Die zurückbleibende weisse Substanz ist sehr rein und kristallisiert aus Alkohol in schönen, weissen Nadeln aus, die kaum hygroskopisch sind. Ausbeute ca 75%. F.P. des Chlorids 263°C.

Analysen: $C_6H_{14}O_3NCl$ (183.64)

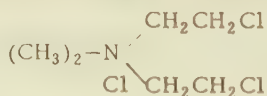
67.85 mg Subst.: Gef.: 3.61 ml 0.1n HCl entspr.: 7.48% N; ber.: 7.63%

59.52 mg Subst.: Gef.: 46.25 mg AgCl entspr.: 19.22% Cl; ber.: 19.3%

8.24 mg Subst.: Gef.: 11.79 mg CO_2 entspr.: 39.05% C; ber.: 39.31%

8.24 mg Subst.: Gef.: 3.32 mg H_2O entspr.: 4.52% H_2 ; ber.: 4.11%

7.) Darstellung des Dimethyl- β -dichloräthyl-ammoniumchlorids



Diese Verbindung wurde aus dem oben beschriebenen N-Dimethyl-N-di-hydroxyäthyl-ammoniumchlorid durch Halogenierung gewonnen.

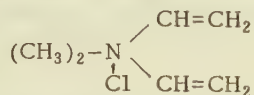
Zu diesem Zweck werden in 150 ml Benzol 40 g dieser Verbindung mit 54 g Thionylchlorid am Rückflusskühler erhitzt. Wenn die Lösung sich dunkel färbt und die SO_2 -Entwicklung nachgelassen hat, lässt man erkalten und über Nacht stehen. Dabei erstarrt die ölige Substanz zu Kristallen, die abgesaugt und aus Alkohol unter Kohlezusatz umkristallisiert werden. Nach öfterer Umkristallisation erhält man rein weisse Kristalle, die nicht wesentlich hygroskopisch sind. Ausbeute 55%. F.P.: Zers. ab 226°C.

Analysen: $C_6H_{14}NCl_3$ (206.55)

73.72 mg Subst.: Gef.: 3.46 ml 0.1n HCl entspr.: 6.57% N; ber.: 6.78%

65.4 mg Subst.: Gef.: 45.79 mg AgCl entspr.: 17.35% Cl; ber.: 17.17%

8.) Darstellung des Dimethyl-divinyl-ammoniumchlorids



Diese Verbindung wurde durch Abspaltung von HCl aus dem oben beschriebenen Dimethyl- β -dichloräthyl-ammoniumchlorid erhalten.

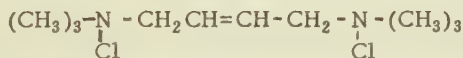
9 g der obigen Verbindung werden in der Kälte zu alkoholischer Kalilauge gegeben, die aus 5 g KOH und 150 ml abs. Alkohol dargestellt wurde. Man lässt über Nacht im Dunkeln stehen, filtriert dann von dem ausgeschiedenen Kaliumchlorid ab und fällt zunächst mit der dreifachen Menge Äther. Man erhält dabei eine sulzige Substanz, die durch öftere Umfällung mit Alkohol-Äther gereinigt wird, aber erst nach längerem Stehen im Vakuumexsiccator kristallin wird. Das Chlorid ist an der Luft äusserst zerfliesslich. Zu Analysenzwecken wurde die Verbindung aus Alkohol mit Perchlorsäure ausgefällt. F.P. des Chlorids etwa 60-70°C; F.P. des Perchlorats 251°C.

Analysen: $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NClO}_4$ (197.62)

94.5 mg Subst.: Gef.: 4.65 ml 0.1n HCl entspr. 6.9% N; ber.: 7.08%.

65.4 mg Subst.: Gef.: 45.3 mg KClO_4 entspr. 49.7% ClO_4 ; ber.: 50.25%.

9.) Darstellung des Buten(2)-1,4-bis-trimethylammoniumchlorids



In eine trockene Apparatur mit Claisenaufsatz und Rückflusskühler gibt man 200 ml absoluten Alkohol und 24.0 g 1,4-Dichlorbuten(2) und erhitzt zum Sieden. Durch ein Einleitrohr leitet man im Laufe von fünf Stunden 25.0 g trockenes Trimethylamin ein. Man lässt über Nacht stehen und filtriert am Morgen den dicken Niederschlag von Buten(2)-1,4-bis-trimethylammoniumchlorid ab. Er ist ziemlich schwer löslich in Alkohol, fast unlöslich in Aceton, Essigsäure und unlöslich in den anderen organischen Lösungsmitteln, wie Äther, Chloroform, Essigester etc. Man kristallisiert aus verdünntem Alkohol um. Ausbeute ca 80-90%. F.P. des Chlorids 286/87°C.

Löst man das Produkt in verdünntem Alkohol und gibt Perchlorsäure dazu, so fällt das Perchlorat vom F.P. 353°C aus.

Analysen: $\text{C}_{10}\text{H}_{24}\text{N}_2(\text{ClO}_4)_2$ (371.22)

102.3 mg Subst.: Gef.: 5.44 ml 0.1n HCl entspr.: 7.48% N; ber.: 7.54%.

29.4 mg Subst.: Gef.: 22.0 mg KClO_4 entspr.: 53.7% ClO_4 ; ber.: 53.6 %.

10.) Darstellung des 2,3-Dioxybutyl-1,4-bis-trimethylammoniumchlorids



Man löst 10 g Buten-(2)-1,4-bis-trimethylammoniumchlorid in Wasser und oxydiert bei 0°C unter Rühren mit 1proz. Kaliumpermanganatlösung in sehr grossem Überschuss. Nachdem von Mangandioxydhydrat abfiltriert ist, wird die Lösung mit Salzsäure schwach angesäuert und im Vakuum zur Trockne verdampft. Man nimmt den Rückstand mehrmals in absolutem Alkohol auf, um die Trennung von Kaliumchlorid zu erreichen, und fällt zum Schluss mit Äther aus. Zur Reinigung kristallisiert man aus Alkohol um. Das Chlorid ist löslich in Aceton, Alkohol, leicht löslich in Wasser, unlöslich in Äther und Chloroform.
Zers. P. 216°C.

Das Perchlorat wird in üblicher Weise hergestellt und hat den Schmelzpunkt von 284°C.

Analysen: $\text{C}_{10}\text{H}_{26}\text{O}_2\text{N}_2\text{Cl}_2$ (277.2)

39.9 mg Subst.: Gef.: 2.85 ml 0.1n AgNO_3 , entspr. 25.4% Cl; ber.: 25.55%.

Perchlorat: $\text{C}_{10}\text{H}_{26}\text{O}_2\text{N}_2(\text{ClO}_4)_2$ (405.2).

20.5 mg Subst.: Gef.: 14.0 mg KClO_4 entspr. 49.03% ClO_4 ; ber.: 49.32%.

VII. Überführung der Bromide in die Chloride

Der übliche Weg, Umsetzung mit Silberoxyd und Zugabe von HCl , erwies sich aus verschiedenen Gründen nicht gangbar. Bei den Verbindungen mit Halogenalkyl im Molekül würde in wässriger Lösung durch das Silberhydroxyd das Halogen aus der Kette abgespalten, während bei den ungesättigten Verbindungen durch die oxydierende Wirkung des Silberoxyds die Doppelbindung zerstört würde. Ausserdem ist bei den labileren Substanzen bereits in der Kälte durch das Silberoxyd ein Abbau der quartären Amine nach Hoffmann festzustellen.

Aus diesen Gründen wurde folgender Weg beschritten: Die umzuhalogenierenden Verbindungen wurden in wässriger Lösung mit der genau berechneten Menge Silbersulfat in das Sulfat übergeführt und vom ausgeschiedenen Silberbromid abfiltriert. Sodann wurde das Filtrat wieder in doppelter Umsetzung mit der berechneten Menge Bariumchlorid umgesetzt. Auf diese Weise verlief die Umhalogenierung sehr glatt und es liessen sich weder Bromidionen noch Sulfationen bei den umgesetzten Substanzen mehr nachweisen.

Zu den Versuchen mit der Cholindehydrogenase wurden nur Chloride verwendet, welche, wenn sie nicht bereits von der Darstellung her als solche vorlagen, auf diesem Weg hergestellt wurden.

VIII. Toxizitätswerte einiger neuer Ammoniumsalze

Die Bestimmung der Dosis letalis und der Dosis tolerata bei einigen neuen Ammoniumsalzen war durch das freundliche Entgegenkommen von Herrn Dr. B. Freytag, Bakteriolog. Inst. München, ermöglicht. Die Versuche wurden bei Mäusen von ca 20 g Körpergewicht nach der üblichen Methode durchgeführt.

In Tabelle 14 sind die untersuchten Verbindungen, welche als Chloride zur Anwendung gelangten, sowie die letale und verträgliche Dosis aufgeführt.

Tab. 14: Toxizität einiger Ammoniumverbindungen bei Mäusen

Verbindung	Dosis letalis	Dosis tolerata
$(\text{CH}_3)_3\overset{\oplus}{\text{N}}-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2\overset{\oplus}{\text{N}}(\text{CH}_3)_3$	200 γ	150 γ
$(\text{CH}_3)_3\overset{\oplus}{\text{N}}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$	200 γ	100 γ
$(\text{CH}_3)_2\overset{\oplus}{\text{N}}-(\text{HC}=\text{CH}_2)_2$	500 γ	300 γ
$(\text{CH}_3)_2\overset{\oplus}{\text{N}}\begin{array}{l} \text{CH}=\text{CH}_2 \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	300 γ	100 γ
$(\text{CH}_3)_2\overset{\oplus}{\text{N}}\begin{array}{l} \text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br} \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	2 mg	1 mg
$(\text{CH}_3)_2\overset{\oplus}{\text{N}}\begin{array}{l} \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	3 mg	2 mg

Es stellte sich vor allem bei den Verbindungen mit ungesättigten Gruppen im Molekül eine starke Toxizität heraus, für die das Neurinmolekül das typische Beispiel ist. Worauf – chemisch gesehen – diese starke Toxizität von Verbindungen mit Doppelbindung beruht, ist noch ungeklärt.

D) ZUSAMMENFASSUNG

Die Arbeit befasst sich mit der Oxydation von Cholin durch das in Rattenlebermitochondrien enthaltene Enzymsystem der Cholindehydrogenase. Durch manometrische Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs bei der Cholinveratmung und durch kolorimetrische Bestimmung des Oxydationsvorganges mit löslicher Cholindehydrogenase wurden Untersuchungen angestellt bezüglich der vorliegenden Reaktionsordnung, Selektivität und Spezifität des Enzyms, sowie Inhibition und Aktivierung durch verschiedene Hemmstoffe und biologische Katalysatoren.

Die Cholindehydrogenase wurde durch Cholsäure aus den Mitochondrien extrahiert. In dieser löslichen Form konnte eine kolorimetrische Methode zur Umsatzbestimmung bei Verwendung von Dichlorphenolindophenol ausgearbeitet werden.

Die Dehydrierung des Cholins durch die Cholindehydrogenase scheint einer Reaktion 1. Ordnung zu folgen, wobei nach einer Versuchsdauer von 10-12 Minuten eine Abweichung von der 1. Reaktionsordnung auftritt, welche auf das entstandene Reaktionsprodukt, Betinaldehyd, zurückgeführt wird.

Bei der Untersuchung der Spezifität der Cholindehydrogenase wurden cholin-ähnliche Verbindungen als Substrat verwendet, bei denen eine Methylgruppe im Cholinmolekül durch einen aliphatischen Rest mit funktioneller Gruppe ersetzt war. Diese Verbindungen erreichten im Vergleich zu Cholin relative Veratmungsquoten zwischen 97% und 16%. Unter Einbeziehung der Ergebnisse anderer Arbeiten wird eine Tendenz der selektiven Wirkung der Cholindehydrogenase auf die Konfiguration $\text{CH}_3 - \overset{\oplus}{\text{N}} - \underset{\text{H}}{\underset{|}{\text{C}}} - \text{CH}_2\text{OH}$ mit β -ständiger Hydroxylgruppe festgestellt, die aber in keinem Zusammenhang mit der Verwertbarkeit ähnlich gebauter Verbindungen als Methylendonatoren steht.

Die Hemmwirkung dieser Verbindungen, sowie einiger weiterer quartärer Ammoniumsalze mit funktionellen Gruppen im Molekül auf die Cholinoxydation wurde untersucht und bei den angewandten Versuchsbedingungen zwischen 52% und 12% des ungestörten Cholinwerts bei mittleren physiologischen Konzentrationen gefunden. Die Effekte liegen deutlich über den Werten von Salzeffekten und scheinen im System der Cholindehydrogenase typisch für quartäre Ammoniumsalze zu sein.

Bei der Überprüfung dieser Resultate mit löslicher Cholindehydrogenase zeigte sich ebenfalls eine Hemmwirkung. Es wurde festgestellt, dass sich diese Hemmwirkung bei Neurin aus einer kompetitiven und nicht kompetitiven Hemmung zusammensetzt; eine Auflösungsmethode für diese Überlagerung der beiden Hemmungstypen wurde ausgearbeitet.

Die Darstellung der oben angeführten Ammoniumsalze wird, soweit sie bisher noch nicht in der Literatur beschrieben sind, gebracht, sowie ihre Daten und Analysenwerte. Von einigen dieser Verbindungen wird die Toxizität bei Mäusen angeführt.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluss von GSH (Glutathion-red.) auf die Cholindehydrogenase in vitro studiert, wobei eine deutliche Hemmwirkung beobachtet wurde. Geringe Mengen Schwermetallsalze haben auf diese Inhibition keine Wirkung, grössere Mengen Fe^{++} und Cu^{++} oder Cytochrom c heben sie weitgehend auf. Die möglichen Ursachen für die Hemmwirkung von GSH werden diskutiert und als wahrscheinlichste eine durch GSH verursachte Störung im Wasserstofftransportsystem der Cholindehydrogenase in Erwägung gezogen. Für das von verschiedenen Seiten vermutete Vorhandensein einer Sulfhydrylgruppe in der prosthetischen Gruppe des Enzyms konnten keine Anhaltspunkte erhalten werden.

Mit D, L-Thyroxin und Phyllochinon wurden weitere biologische Katalysatoren im Zusammenhang mit der Cholinoxydation getestet. In beiden Fällen wurden in vivo und in vitro Versuche angestellt. Während bei den Versuchen in vivo mit Thyroxin infolge von Intoxikationswirkungen keine eindeutigen Effekte auftraten, zeigte sich bei den Untersuchungen in vitro eine konzentrationsabhängige Wirkung. Inkubation der Mitochondrien mit geringen Konzentrationen an Thyroxin führte zu einer klaren Umsatzsteigerung bei der Cholinveratmung, während höhere Dosen an Thyroxin eine Umsatzsenkung verursachten. Die steigernde Wirkung wird auf eine Entkoppelung von oxydativer Phosphorylierung und Atmungskette zurückgeführt. Die Umkehr der Wirkung bei höheren Konzentrationen ist eine bei Thyroxin häufig zu beobachtende Erscheinung, für die bisher keine exakte Erklärung vorhanden ist. Es wird vermutet, dass das Enzym Cholindehydrogenase nicht der Ansatzpunkt des Thyroxins ist.

Auch beim Phyllochinon (Vitamin K_1) konnte ein Einfluss des Vitamins auf die Cholinveratmungsquote bei Rattenlebermitochondrien festgestellt werden. Bei Mitochondrien von K_1 -Mangeltieren wurde bei Cholinveratmung ein durchschnittlicher Abfall des Sauerstoffverbrauchs von 17% beobachtet, der nach länger dauernder Inkubation mit K_1 weitgehend aufgehoben werden konnte. Bei den Mitochondrien von Normaltieren war dagegen Inkubation mit K_1 ohne Wirkung. Über den Ansatzpunkt des Phyllochinons im System der Cholindehydrogenase kann nach diesen orientierenden Untersuchungen noch kein Urteil abgegeben werden.

Literaturverzeichnis

- 1) F. BERNHEIM u. M. L. C. BERNHEIM Amer. J. Physiol. 104, 438 (1933)
- 2) O. A. TROWELL J. Physiology 85, 356 (1935)
- 3) P. J. G. MANN u. J. H. QUASTEL Biochem. J. 31, 869 (1937)
- 4) P. J. G. MANN, H. E. WOODWARD Biochem. J. 32, 1024 (1938)
u. J. H. QUASTEL
- 5) F. BERNHEIM u. M. L. C. BERNHEIM Amer. J. Physiol. 121, 55 (1938)
- 6) F. BERNHEIM J. biol. Chemistry 133, 291 (1940)
- 7) J. R. KLEIN u. P. J. H. HANDLER J. biol. Chemistry 144, 537 (1942)
- 8) T. H. LAN J. biol. Chemistry 151, 171 (1943)
- 9) G. S. EADIE u. F. BERNHEIM J. biol. Chemistry 185, 731 (1950)
- 10) J. N. WILLIAMS jr. J. biol. Chemistry 198, 579 (1952)
- 11) C. H. ANGEL u. O. N. MILLER Federation Proc. 11, 435 (1952)
- 12) J. N. WILLIAMS jr., G. LITWACK J. biol. Chemistry 192, 73 (1950)
u. C. A. ELVEHJEM
- 13) D. R. STRENGTH, J. R. CHRISTEN- J. biol. Chemistry 203, 63 (1953)
SEN u. L. J. DANIEL
- 14) F. L. HUMOLLER u. H. J. Am. J. Physiol. 177, 279 (1954)
ZIMMERMANN
- 15) N. I. MONDY u. L. J. DANIEL Arch. Biochem. 48, 402 (1954)
- 16) J. N. WILLIAMS jr. J. biol. Chemistry 206, 191 (1954)
- 17) J. N. WILLIAMS jr. u. J. biol. Chemistry 203, 899 (1953)
A. SREENIVASAN
- 18) S. H. WA u. T. C. TUNG J. Formosan. Med. Assoc. 52, 207 (1953)
- 19) H. J. EICHEL J. biol. Chemistry 207, 648 (1954)
- 20) C. J. KENSLE u. H. LANGEMANN J. biol. Chemistry 192, 551 (1951)
- 21) J. N. WILLIAMS jr. J. biol. Chemistry 194, 139 (1952)
- 22) J. N. WILLIAMS jr. J. biol. Chemistry 195, 37 (1952)
- 23) J. R. CHRISTENSEN u. Federation Proc. 12, 189 (1953)
L. J. DANIEL
- 24) C. J. KENSLE u. H. LANGEMANN Proc. Soc. Exp. 85, 304 (1954)
- 25) J. S. DINNING, C. K. KEITH Arch. Biochem. 24, 463 (1949)
u. P. L. DAY
- 26) J. S. DINNING, C. H. KEITH, Arch. Biochem. 27, 89 (1950)
P. L. DAVIS u. P. L. DAY
- 27) J. S. DINNING, u. C. K. KEITH J. biol. Chemistry 189, 213 (1950)
- 28) J. N. WILLIAMS jr. J. biol. Chemistry 192, 81 (1951)
- 29) J. N. WILLIAMS jr. Proc. Soc. Exp. 77, 315 (1951)
- 30) J. N. WILLIAMS jr. Proc. Soc. Exp. 78, 202 (1951)

- 31) J. N. WILLIAMS jr. J. biol. Chemistry 191, 123 (1951)
- 32) J. N. WILLIAMS jr., J. biol. Chemistry 202, 233 (1953)
A. GREENIVASAN, S. C. SUNG u.
C. A. ELVEHJEM
- 33) J. S. DINNING, R. NEATROUR u. J. biol. Chemistry 209, 712 (1954)
P. L. DAY
- 34) E. S. G. BARRON u. T. P. SINGER Science 97, 356 (1943)
- 35) M. CAFIERO Boll. soc. ital. biol. sper. 27, 1426 (1951)
- 36) H. A. ROTHSCHILD, O. CORI u. J. biol. Chemistry 208, 41 (1953)
E. S. G. BARRON
- 37) A. W. MOYER u. V. du VIGNEAUD J. biol. Chemistry 143, 373 (1942)
- 38) Übersichtsreferat: V. du VIGNEAUD, Harvey Lect. 38, 39 (1942/43)
- 39) J. A. MUNTZ J. biol. Chemistry 182, 489 (1950)
- 40) J. W. DUBNOFF u. H. BORSOOK J. biol. Chemistry 176, 789 (1948)
- 41) J. W. DUBNOFF Federation Proc. 8, 195 (1949)
- 42) J. W. DUBNOFF Arch. Biochem. 24, 251 (1949)
- 43) F. LYNEN u. H. SCHERER Liebigs Ann. 560, 163 (1948)
- 44) H. LINEWEAVER u. D. BURK Am. Chem. Soc. 56, 658 (1934)
- 45) I. C. WELLS J. biol. Chemistry 207, 575 (1954)
- 46) Übersichtsreferat: H. B. SCHRÖTER, Pharmazie 10, 146 (1955)
- 47) E. G. S. BARRON, G. R. BARTLETT J. exp. Med. 87, 489 (1948)
u. Z. B. MILLER
- 48) Z. B. MILLER Arch. Biochem. 47, 137 (1953)
- 49) T. SHIMIZA Nagoya J. Med. Sci. 15, 159 (1952)
- 50) H. C. KRÜSKEMPER u. W. DIRSCHERL Biochem. Z. 323, 52 (1952)
- 51) K. LOHMANN Biochem. Z. 254, 332 (1932)
- 52) M. E. PLATT u. E. F. SCHROEDER J. biol. Chemistry 104, 281 (1934)
- 53) G. E. WOODWARD J. biol. Chem. 109, 1 (1935)
- 54) S. J. KLEBANOFF Biochem. J. 64, 425 (1956)
- 55) R. S. LEECH u. C. C. BAILEY J. biol. Chemistry 157, 525 (1945)
- 56) A. LAZAROW Proc. Soc. exp. biol. Med. 61, 441 (1946)
- 57) A. LAZAROW Proc. Soc. exp. biol. Med. 66, 4 (1947)
- 58) W. DOERR, F. BOPP, R. KUHN u. Naturw. 35, 125 (1948)
G. QUADRECK
- 59) A. LAZAROW Experimental diabetes, a symposium,
S. 49, Blackwell, London (1954)
- 60) A. LAZAROW Physiol. Rev. 29, 48 (1949)
- 61) R. A. RESNIK u. A. R. WOLFF Biochem. J. 64, 33 (1956)
- 62) K. DRESEL Kli. Wo. 1928 I 504

- 63) C. NIEMANN u. J. F. MEAD Am. Soc. 63, 2685 (1941)
- 64) E. S. GORDON u. A. E. HEMING Endocr. 34, 353 (1944)
- 65) G. FELDOTT u. H. A. LARDY Fed. Proc. 10, 182 (1951)
- 66) H. NIEMEYER, R. K. CRANE, Fed. Proc. 10, 229 (1951)
E. P. KENNEDY u. F. LIPMANN
- 67) C. MARTIUS u. B. HESS Arch. Biochem. 33, 436 (1951)
- 68) C. F. MALEY u. H. A. LARDY J. biol. Chemistry 204, 437 (1953)
- 69) C. MARTIUS, 5. Coll. der Ges. f. physiol. Chem.
S. 141, Berlin (1955)
- 70) C. MARTIUS u. B. HESS Biochem. Z. 326, 191 (1955)
- 71) C. MARTIUS, H. BIELING u. Biochem. Z. 327, 163 (1955)
D. NITZ-LITZOW
- 72) W. F. LOOMIS u. F. LIPMANN J. biol. Chemistry 173, 807 (1948)
- 73) R. J. CROSS, J. V. TAGGART, J. biol. Chemistry 177, 655 (1949)
G. A. COVO u. D. E. GREEN
- 74) G. N. MARKOFF Beitr. pathol. Anat. 94, 377 (1935)
- 75) S. R. TIPTON, M. J. LEATH, Am. J. Physiol. 145, 693 (1946)
I. H. TIPTON u. W. L. NIXON
- 76) S. R. TIPTON u. W. L. NIXON Endocr. 39, 300 (1946)
- 77) M. REISS, L. SCHWARZ u. Endokrinologie 16, 145 (1935)
F. FLEISCHMANN
- 78) S. R. TIPTON Amer. J. Physiol. 161, 29 (1950)
- 79) J. R. KLEIN J. biol. Chemistry 128, 659 (1939);
131, 139 (1939)
- 80) C. S. WERTLING u. A. A. J. biol. Chemistry 183, 63 (1950)
KNOEPFELMACHER
- 81) H. M. KLITGAARD, H. J. LIPNER, Endocr. 52, 79 (1953)
S. B. BARKER u. T. WINNICK
- 82) C. MARTIUS u. D. NITZ-LITZOW Biochem. Biophys. Acta 12, 134 (1953);
13, 152 (1954); 13, 289 (1954)
- 83) H. W. UMBREIT, R. H. BURRIS u. Manometric techniques and related
J. F. STAUFFER methods for the study of tissue meta-
bolism, Minneapolis 1949.
- 84) W. FRIEDEL Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.
304, 91 (1956).

Lebenslauf

Ich, Anton Kohler, wurde am 2. 4. 1925 in München geboren als Sohn des Chemikers Dr. Martin Kohler und seiner Ehefrau Barbara, geb. Wankel. Nach Besuch der Volksschule in München-Obermenzing besuchte ich von 1935 bis 1939 das humanistische Gymnasium in München-Pasing und von 1939 bis 1943 das humanistische Gymnasium in Kempten/Allg., wo ich 1943 meine Reifeprüfung bestand. Nach Kriegsdienst, Verwundung und Gefangenschaft begann ich 1946 das Studium der Chemie an der Universität München. Im Jahre 1954 legte ich das Diplomexamen für Chemiker ab. Unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dr. H. Niemer war ich im Physiologisch-chemischen Institut der Universität München mit der Bearbeitung meiner Diplomarbeit und der vorliegenden Dissertation beschäftigt.

